

C-6. マウス脳梗塞モデルでの liposome 前投与の効果

Laser ablation および histamine による2種類の血管障害モデルで liposome が障害部位に特異的に集積する性質を有することが判明したことから、脳血流虚血再灌流後に起きる血管内皮障害部位にこの anionic liposome が集積し plasma leakage の増加を抑制する効果をもつ可能性を、マウス脳梗塞モデルを構築し検討した。Blood brain barrier dysfunction の指標となる plasma protein の脳組織への漏出を macroscopic に sham operation、vehicle、および liposome 投与の三群で比較した(図 9A)。

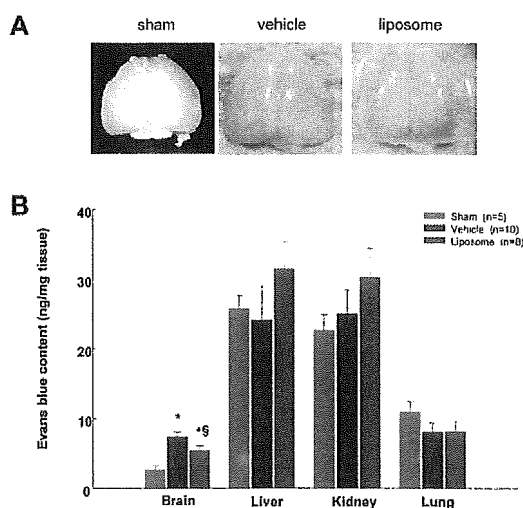


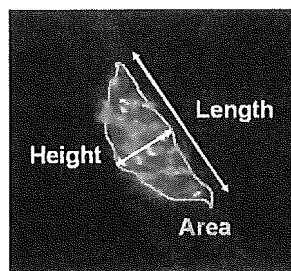
図 9. C57black/6 マウス脳梗塞モデルにおける anionic liposome の効果。A. albumin-bound の Evans blue の脳組織への漏出。B. 各組織における Evans blue の血管外漏出。

Control では Evans blue の leakage はみられないのに対し、虚血再灌流4時間の脳組織では顕著な leakage が認められた。Evans blue (EB) content を測定したところ vehicle 投与群では 7.5 ± 0.5 ng EB/mg brain (n=10)、一方 liposome 投与群では 4.8

± 0.6 ng EB/mg brain (n=10)と有意に減少した(図 9B)。肝臓、腎臓、肺ではこのような差は認められなかった。

C-7. 血流速度と血栓サイズ・形状の経時的変化

図 10 に細静脈で行った laser ablation 後の血栓サイズ・形状の経時的変化を示した。測定した血栓の面積(area)、かさ高さ(height)、血管壁に密着する基底部の長さ(length)の平均値を plot した。



Phosphodiesterase 阻害剤は破綻性出血惹起後約 30 秒以内という非常に早い time point で形成される initial plug の形成速度には影響を与えないが、その後の血栓形成は抑制することが判明した。area, height, length の三つの parameter とともに、phosphodiesterase 阻害剤、aspirin 投与両群のいくつかの time point で control 群に比べて有意な減少が認められた (ANOVA、Fisher's multiple comparison, $p < 0.05$)。Control 群において血栓のかさ高さが時間とともに増すのに対し、phosphodiesterase 阻害剤投与群ではかさ高さの低い血栓が形成される傾向がみられた。Aspirin でも同様の傾向が認められた。

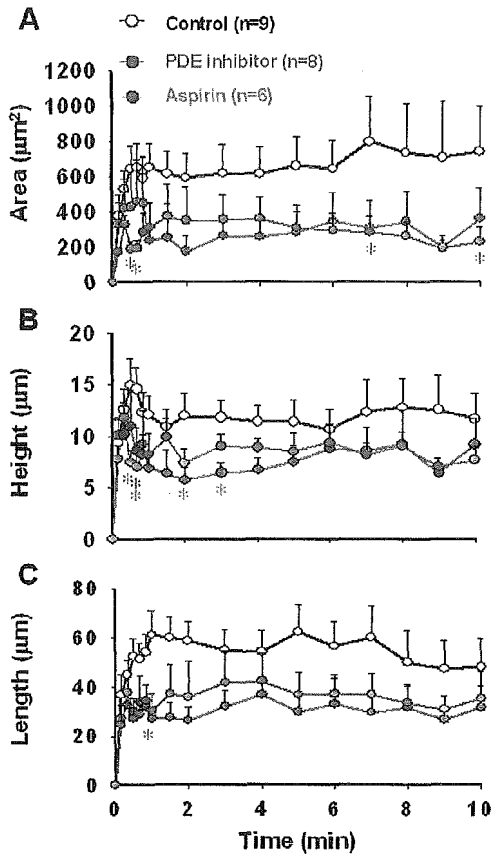


図 10 血栓の形状の経時的変化。血栓の面積(A)、血管壁からの最大高 (B)、基底部幅最大高 (C)。

C-8 血栓と血流中の血小板との相互作用に及ぼす血小板機能抑制剤の影響

図 11 に、形成された一次血栓と血流中の血小板との相互作用を解析した結果を示した。一分間毎に剥離した血小板 (flying thrombus) の個数を凝集塊のサイズ別に方法に記したように5つのグループに分け、10分間で剥離した血小板の総個数として示した。

血流中の単一血小板の血栓への“touch-and-go”には、3群間で差を認めなかった。しかし、図 11 の C に示すような血小板 6 から 10 個で形成される比較的大きな凝集塊の剥離する回数は、

phosphodiesterase 阻害剤、aspirin 投与によって有意に減少した。この結果より、これらの阻害剤には、梗塞や狭窄の原因となる大きなサイズの血栓が障害部位下流に飛ばす確率を減少させるような効果があることが示唆された。

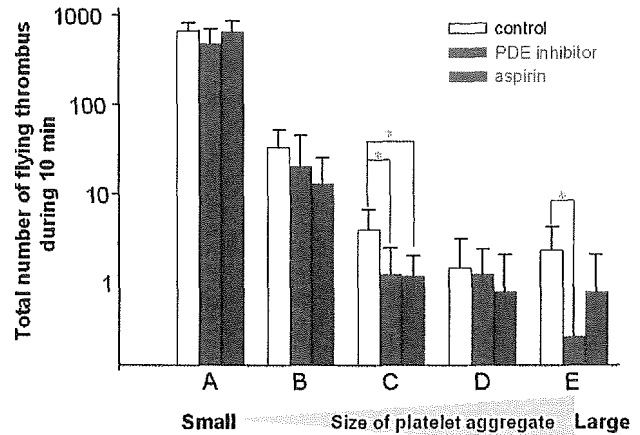


図 11. Laser ablation により形成された一次血栓と血流中の血小板との相互作用に及ぼす血小板機能抑制剤の影響。10分間に剥離した血小板 (flying thrombus) の個数を剥離した凝集塊のサイズ別に示した。単一血小板 (A)、2-5 個でなる小凝集塊 (B)、6-10 個でなる中凝集塊 (C)、11-15 個でなる中凝集塊 (D)、15 個以上の大凝集塊 (E)。*, $p < 0.05$ by Mann-Whitney U test.

C-9. 血小板機能抑制剤の止血プロセスに及ぼす効果

破綻性出血惹起後の微小血管における止血プロセスを評価するため、以下のような解析を行った。図 12 に示すように、記録した透過光画像をもとに ablation 部位から血管外に漏出した赤血球が占める面積を laser ablation 直後と 10 分後で測定し、その差を bleeding index として算定した。

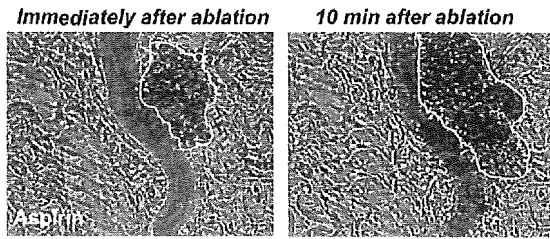


図 12. Laser ablation 直後（左）および 10 分後の細静脈周辺の透過光画像。線で囲んだ部分が赤血球の漏出部位。

図 13 に、control、phosphodiesterase 阻害剤、および aspirin 投与群での laser ablation 後 10 分の画像を示した。

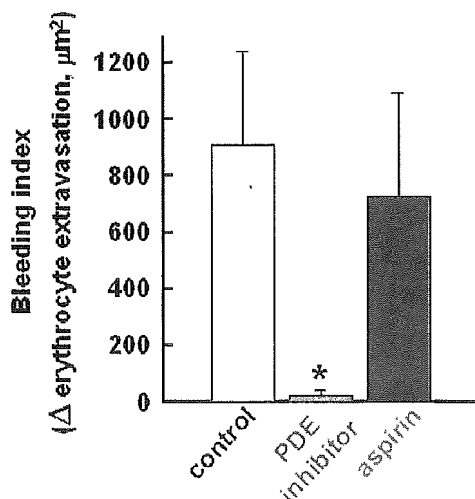
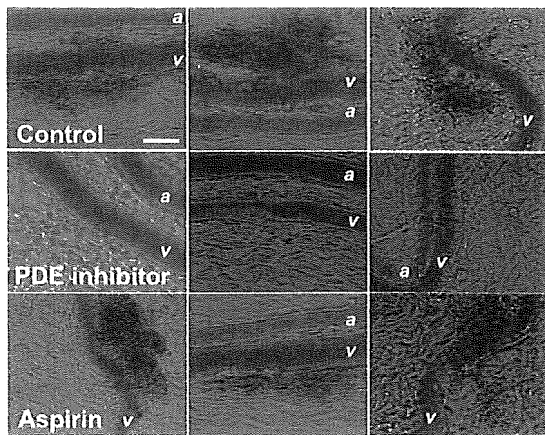


図 13. 止血プロセスに及ぼす血小板機能抑制剤の効果。

Control と aspirin 群では、顕著な赤血球の血管外漏出が認められるのに対し、phosphodiesterase 阻害剤投与後は、ablation 後も、ほとんど赤血球の漏出が認められず、明らかにこの群で bleeding index が減少していることが判明した。

この結果より、phosphodiesterase 阻害剤が、不必要な血栓形成を抑制する効果を持ちながらも、生体内で起こるべき止血効果を阻害せずむしろ止血作用を増強させる効果を有することが示唆された。

D. 結論

liposome は、生体膜の構成成分であるリン脂質を水中に比較的低濃度で分散させた時に形成されるナノサイズの閉鎖小胞体である。本粒子の生体膜類似性ゆえ血液適合性が高く、粒子表面に血小板凝集関連蛋白質を担持させた人工血小板の構築、及び drug delivery system としての利用を目指した研究が盛んに行われている。しかしながら、本粒子自体の微小循環系内の挙動については不明な点が多いことから、本研究ではこの粒子の挙動を *in vivo* で解析することを試みた。その結果、本研究班で作製した PEG modified anionic liposome には血管内皮細胞障害部位へ集積、漏出する性質があり、血管内皮下腔に集積し障害部位を充填する可能性があること、その作用は血小板との相互作用に依存していないことが示唆された。

Laser ablation により微小血管に破綻性出血を作製し、障害部位で形成される血小板血栓周辺での rhodamine 標識-liposome 及び CFSE 標識-血小板の挙動を confocal microscopy によりリアルタイムで撮像する imaging 技術を構築した。

この新規実験系により、これまで詳細が不明であった血栓形成部位での血小板の接着現象や局所での hemodynamics の変動をリアルタイムで追跡することが可能となった。この系を用い、異なる作用機序を有する抗血小板薬であるアスピリン（cyclooxygenase 阻害剤）および phosphodiesterase 阻害剤の抗血栓効果を評価したところ、二つの血小板機能抑制剤の効果を区別化することが可能であることが判明した。人工血小板の実用化に必須のプロセスである人工血小板粒子の生体内挙動を評価する観点より、この実験系が有用であることが示唆された。

E. 健康危険情報

なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

関連特許取得

リポソーム安定化剤

（発明代表者 特願 2003-63803）

An assay system for examining function or ability of cells, tissues or organs.

（発明代表者 出願番号 60/506, 506）

G. 研究発表

I. 論文発表

1. Suematsu M, Sukanuma K, Kashiwagi S. Mechanistic probing of gaseous signal transduction in microcirculation. *Antioxid Redox Signal*. 5: 485-492, 2003.

2. Schaefer S, Kajimura M, Tsuyama S, Uchida K, Sato E, Inoue M, Suematsu M, and Watanabe K. Aberrant utilization of nitric oxide and regulation of soluble guanylate cyclase in rat diabetic retinopathy. *Antioxid Redox Signal*. 5: 457-565, 2003.

3. Norimizu S, Kudo A, Kajimura M, Ishikawa K, Tani H, Yamaguchi T, Fujii K, Arie S, Nimura Y, and Suematsu M. Carbon monoxide stimulates mrp2-dependent excretion of bilirubin-IXalpha into bile in the perfused rat liver. *Antioxid Redox Signal*.5:449-456, 2003.

4. Suematsu M. Quartet signal transducers in gas biology. *Antioxid Redox Signal*.5: 435-437, 2003.

5. Katagiri H, Ito Y, Ishii K, Hayashi I, Suematsu M, Yamashina S, Murata T, Narumiya S, Kakita A, and Majima M. Role of thromboxane derived from COX-1 and -2 in hepatic microcirculatory dysfunction during endotoxemia in mice. *Hepatology*. 39: 139-150, 2004.

6. Kudo A, Kashiwagi S, Kajimura M, Yoshimura Y, Uchida K, Arie S, and Suematsu M. Kupffer cells alter organic anion transport through multidrug resistance protein 2 in the post-cold ischemic rat liver *Hepatology*.39: 1099-1109, 2004.

7. Hattan, N., Kawaguchi, H., Ando, K., Kuwabara, E., Fujita, J., Murata, M., Suematsu, M., Mori, H., Fukuda, K. Purified cardiomyocytes from bone marrow mesenchymal stem cells produce stable intracardiac grafts in mice. *Cardiovasc. Res*. 65(2), 334-344, 2005.

8. Fujii, K., Sakuragawa, T., Kashiba, M., Sugiura, Y., Maruyama, K., Goda, N., Nimura, Y., Suematsu, M. Hydrogen sulfide as an endogenous modulator of biliary bicarbonate excretion in the rat liver. *Antioxid. Redox Signaling* 7(5-6), 788-794, 2005.

9. Suematsu, M., Tsukada, K., Tajima, T., Yamamoto, T., Ochiai, D., Watanabe, H., Yoshimura, Y., Goda, N. Carbon monoxide as a guardian against hepatobiliary dysfunction. *Alcohol Clin Exp Res* 29(11), 134S-139S, 2005.

10. Ishikawa, M., Kajimura, M., Adachi, T., Maruyama, K., Makino, N., Goda, N., Yamaguchi, T., Sekizuka, E., Suematsu, M. Carbon monoxide from heme oxygenase-2 is a tonic regulator against nitric oxide-dependent vasodilatation in the adult rat cerebral microcirculation. *Circ. Res.* 97(12), e104-e114, 2005.

11. Suganuma, K., Tsukada, K., Tsuneshige, A., Kashiba, M., Yonetani, T., Suematsu, M. T-state stabilization of hemoglobin allostery by nitric oxide: a protection against post-ischemic hepatobiliary dysfunction. *Antioxid. Redox Signaling* (in press).

12. Yamashita, T., Shoge, M., Oda, E., Yamamoto, Y., Giddings, J.C., Kashiwagi, S., Suematsu, M., Yamamoto, J. The free radical scavenger, edaravone, augments NO release from vascular cells and platelets after laser-induced acute endothelial injury in vivo. *Platelets* (in press).

II. 邦文原著 著書

1. 梶村 眞弓、津山 信吾。一酸化炭素による可溶性グアニル酸シクラーゼの調節 *Molecular Medicine* 40 166-171, 2003.

2. 梶村 眞弓、柏木 哲、市川 美緒、末松 誠。ガス状メディエーターの生体内挙動 *血管医学* 5 45-53, 2004.

3. 末松 誠、梶村 眞弓、足立 健。ヘムオキシゲナーゼ-CO 系ニボル血管機能制御機構と NO システムとの相互作用 *細胞工学* 25 161-165, 2006.

III. 学会発表

1. 細動脈における非内皮細胞由来の NO の存在：ラット腸間膜微小循環をモデルとした NO の bioavailability と NO 合成酵素の局在、梶村 眞弓、第 3 回日本 NO 学会、2003 年 5 月 29 日（熊本）

2. 一酸化炭素による可溶性グアニル酸シクラーゼの調節、梶村 眞弓、第 12 回日本バイオイメージング学会、2003 年 10 月 12 日（横浜）

3. レーザーアブレイションによるリポソームの微小循環系での挙動、梶村 眞弓、第 29 回日本微小循環学会、2004 年 2 月 19 日（熊本）

4. Suematsu M., Kajimura M., Kashiwagi S., Tsuchiya S. Free Radical Bioimaging in Microcirculation. The 50th Microcirculatory Society, **HISTORICAL POSTER** 2004 年 4 月 5 日 (Washington DC, USA)

5. メタボローム：網羅的代謝解析技術によるガス分子を解した新しい臓器機能制御機構の解明、末松 誠、第 3 回生態機能研究会、2004 年 7 月 23 日（箱根）

6. Erythrocytes as an oxygen-sensing regulator of glycolysis and adenosine metabolism: Evidence from high-throughput metabolome analysis. 末松 誠、The 2nd Japan-United Kingdom Platelet Conference, 2004 年 9 月 2 日 (Oxford, United Kingdom)

7. Real-time imaging of anionic liposomes during thrombus formation and acute inflammation in rats Kajimura M., Ichikawa M., Sakai H., Takeoka S., Tsuchida E. and Suematsu M., The 2nd Japan-United Kingdom Platelet Conference, 2004 年 9 月 3 日 (Oxford, United Kingdom)

8. 網羅的代謝解析法による CO の新しい標的分子の検索とその病態生理学的意義、末松 誠、第 1 回 Heme Oxygenase 研究フォーラム、

特別講演、2004年9月4日（京都）

9. メタボローム解析からわかる赤血球の低酸素応答とその臨床的意義、末松 誠、第19回日本救命医療学会総会、2004年9月17日（東京）

10. メタボローム解析技術による新規代謝制御系の探索、末松 誠、BioJapan 2004、2004年9月30日（東京）

11. Roles of hemoglobin allostery in oxygen sensing in erythrocytes: Evidence from metabolome analysis. 末松 誠、The 2nd Kyoto University International symposium “Leading Project for Biosimulation”. 2004年9月27日（京都）

12. Visualization of gaseous signalings *in vivo*、梶村真弓、末松 誠、The 9th Keio Medical Award Symposium、2004年11月30日（東京）

13. メタボローム解析法による赤血球の新しい生理作用の検索、末松 誠、第27回日本分子生物学会、2004年11月30日（神戸）

14. メタボローム解析法による赤血球の新しい生物作用の検索と医学への応用、末松 誠、慶應義塾先端科学技術シンポジウム、2005年1月28日（東京）

15. Anionic liposome protects murine brain against plasma leakage after ischemia reperfusion, Kajimura M., Sakai H., Takeoka S., Tsuchida E., Ichikawa M., and Suematsu M. The 6th Asian Congress for Microcirculation, 2005年2月24日（東京）

16. Carbon monoxide from heme oxygenase-2 is a tonic regulator against nitric oxide-dependent vasodilatation in the adult rat cerebral microcirculation, The 4th international

conference for heme oxygenase, Kajimura M., Ishikawa M., Goda N., Suematsu M. 2005年10月3日（Boston, USA）

17. Carbon monoxide from heme oxygenase-2 is a tonic regulator against nitric oxide-dependent vasodilatation in the adult rat cerebral microcirculation、梶村 真弓、第78回日本生化学会、2005年11月23日（神戸）

18. Carbon monoxide suppresses NO generation in cultured porcine aortic endothelial cells、梶村 真弓、第31回日本微小循環学会、2006年2月10日（東京）

備考

本報告書における phosphodiesterase 阻害剤の表記に関しては、知的所有権確保のため名称を削除した。

本実験を施行するにあたっての3次元血栓撮像装置は、文部科学省21世紀リーディングプロジェクト生体・細胞機能シミュレーションプロジェクト「網羅的代謝計測技術に基づく細胞シミュレーションの構築とその応用並びに支援・基盤領域の研究開発」の助成金で導入したものである。本厚生科研費では血栓止血の定量的評価にこれを利用し、文部科学省21世紀リーディングプロジェクトでは血小板血栓止血シミュレーションの仮想実験の実証に利用しており、双方の実験内容に重複がないことを記す。

平成 15-17 年度厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業
分担総合研究報告書

α IIb β 3 インテグリン活性化機構の解明

分担研究者 鎌田徹治 慶應義塾大学医学部 解剖学教室 専任講師

【研究要旨】

血小板は出血部位で生成された ADP、トロンビンなどの血小板アゴニストによる刺激で活性化を受け、損傷血管壁あるいは互いに接着することによって止血血栓を形成する。この働きは、血小板では α IIb β 3 インテグリンなどの血小板膜蛋白質とフィブリノーゲンなどの血漿蛋白質との結合によって媒介される。有効かつ安全な人工血小板を開発するためには、血小板と同様に出血部位のみで凝集する機能を付与することが不可欠である。したがって α IIb β 3 インテグリンの活性化メカニズムを解明することは、この目的を達成するうえで非常に重要なテーマである。立体構造の解析から、 α IIb β 3 インテグリンには bent と extended の少なくとも二つの conformer があり、血小板の活性化に伴って bent conformer から extended conformer に大きく立体構造を変えると考えられている。すなわち、bent conformer は low-affinity form であり、extended conformer は high-affinity form であると考えられているが、詳細は不明である。また、血小板アゴニスト刺激による inside-out signaling が、どのようなメカニズムで細胞外の α IIb β 3 の構造変化を誘導するかについてはほとんど解明されていない。そこで本研究では、CHO 細胞上に発現した組換え α IIb β 3 とフィブリノーゲンとの結合を解析することにより、 α IIb β 3 インテグリン活性化のメカニズムを構造面から解明した。その結果、 α IIb β 3 インテグリンの bent conformer は low-affinity form、extended conformer は high-affinity form であることが確認された。また inside-out signaling による α IIb β 3 の活性化は、 α 鎖と β 鎖の細胞内ドメインの解離に引き続いて細胞外ドメインの α/β stalk 間結合が解離することによって誘導されることが明らかになった。すなわち、血小板では α IIb β 3 の α/β stalk 間結合の解離が bent から extended conformer への構造変化を惹起し、 α IIb β 3 の活性化を誘導すると考えられる。これらの結果から、inside-out signaling に依存せず、出血部位において bent conformer から extended conformer へ構造を変換する機能をもった組換え α IIb β 3 を開発できれば、人工血小板に応用することが十分可能であると考えられる。

1. 研究目的

一次止血血栓形成過程では、まず血小板が破綻した血管内皮下組織へ粘着し、これに引き続き血小板同士が結合して血小板凝集塊を形成する。この血小板凝集形成のためには α IIb β 3 インテグリンの存在が不可欠である。血小板膜上の α IIb β 3 インテグリンは通常リガンドに対する親和性が低く、血小板凝集を引き起こすことはない。しかし、いったん血小板が活性化すると α IIb β 3はその立体構造を変えて高親和性となり、フィブリノーゲンと結合して血小板凝集をおこすと考えられている。従来の電子顕微鏡を用いた α IIb β 3の構造解析では、インテグリン N 末端側が球状のリガンド結合部位を形成し、C 末端は α 鎖・ β 鎖ともに棒状の stalk (tail) を形成することが観察されていた。ところが2001年の結晶構造解析で α V β 3は、 α/β stalk の途中で折れ曲がり球状ドメインを下に向けたいわゆる bent conformer を呈していた。その後の α V β 3の高解像度電子顕微鏡解析でも、インテグリンには従来の電子顕微鏡像でみられた extended conformer と結晶構造でみられた bent conformer が存在し、 Mn^{2+} あるいは RGD ペプチドの存在下で extended conformer が有意に増加することが示された (図 A)。以上の結果から、インテグリンは活性化

に伴って low-affinity form である bent conformer から high-affinity form である extended conformer へ構造変化をおこすというパラダイムが形成された。しかし、最近 α V β 3 インテグリンの

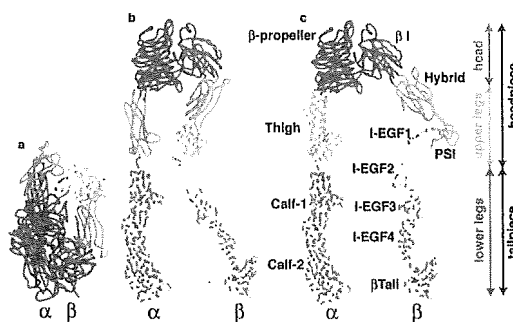


図 A

bent conformer がフィブロネクチンと結合することが電子顕微鏡で示されるなど、このパラダイムを疑問視する結果も報告されている。

仮にこのパラダイムが正しいとすると、血小板 α IIb β 3は活性化に伴い bent conformer から extended conformer へその構造を大きく変化させることになる。しかし、そのメカニズムは全く解明されていない。血小板 α IIb β 3の活性は inside-out signaling よって調節されるだけでなく、二価イオンによって大きな影響を受ける。一般的に二価イオンはインテグリンとリガンドの結合に不可欠であるばかりでなく、インテグリン活性にも大きな影響を与える。中でも Mn^{2+} は強い活性化作用を有することが知られている。これらの二価イオンはインテグリン分子

中に存在する二価イオン結合部位に結合することによってリガンド結合に関与すると考えられる。 $\alpha V\beta 3$ 結晶構造の解析からインテグリン α 鎖には 5 箇所、 β 鎖には 3 箇所の二価イオン結合部位が存在することが明らかにされたが、最近 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} イオンが β 鎖の 3 箇所の二価イオン結合部位に結合することによってリガンド結合に影響を与えることが明らかにされた。しかし、 α 鎖の二価イオン結合部位の役割はいまだ不明である。血小板の主要インテグリンである $\alpha IIb\beta 3$ と内皮細胞などに存在する $\alpha V\beta 3$ は共通の β 鎖をもち、 α 鎖も一次構造上高い相同性を有する。機能的にもこれらのインテグリンは共にフィブリノーゲン、フィブロネクチン、ビトロネクチンなどと RGD 依存性に結合することが知られている。このように、 $\alpha IIb\beta 3$ と $\alpha V\beta 3$ は高い構造的・機能的相同性を有するが、不思議なことに Mn^{2+} に対しては異なった反応を示す。 Mn^{2+} は $\alpha V\beta 3$ に対し強いリガンド結合を誘導するが、 $\alpha IIb\beta 3$ に対する作用は非常に弱い。この Mn^{2+} に対する二つの $\beta 3$ インテグリンの反応性の違いを利用し、 αIIb と αV のキメラ分子を作成してその Mn^{2+} 存在下でのリガンド結合を解析することにより、インテグリン α 鎖における活性調節に重要な部位を同定することが

可能である。これらの情報は inside-out signaling による活性調節のメカニズム解明のためにも有用であろう。

そこで本研究の目的は 1) インテグリン bent conformer が低親和性であり extended conformer が高親和性であることを実証する。2) $\alpha IIb\beta 3$ の活性調節に重要な部位を同定し、活性化に伴う bent conformer から extended conformer への構造変化のメカニズムを解明する。3) 以上の結果をもとに人工血小板への応用を視野に入れ、活性調節可能な $\alpha IIb\beta 3$ の設計を行う。

2. 研究方法

1) モノクローナル抗体

本研究では以下のモノクローナル抗体を使用した。

PL98DF6 ; 抗 αIIb 抗体

SZ22 ; 抗 αIIb 抗体

VNR5-2 ; 抗 $\beta 3$ 抗体

PT25-2 ; 抗 $\alpha IIb\beta 3$ 活性化抗体

anti-LIBS-1 ; 抗 $\beta 3$ 活性化依存性抗体

anti-LIBS-2 ; 抗 $\beta 3$ 活性化依存性抗体

II) $\alpha IIb/\alpha V$ キメラ, 変異 αIIb ,

αV , $\beta 3$ cDNA の作成

インテグリン α 鎖の細胞外ドメインは N 末端側から β -propeller、thigh、calf-1、calf-2 ドメインで構成される。図 10A に示すように計 11 個の $\alpha IIb/\alpha V$ キメラ分子を作成した。各ドメインの境界は $\alpha V\beta 3$ インテグリン

ンの結晶構造をもとに設定し、各 α Iib/ α V キメラ cDNA は overlap extension PCR 法により作成した。変異 α Iib、 α V、 β 3 cDNA はともに site-directed mutagenesis 法を用いて作成した。 α Iib、 β 3 cDNA は哺乳動物発現ベクター-pBJ-1 に挿入して用いた。

III) トランスフェクション

Chinese hamster ovary (CHO) cell は 10%FCS 加 Dulbecco's modified Eagle medium で培養した。Wild-type α Iib-pBJ1 50 μ g とともに変異 β 3-pBJ1 50 μ g を電気穿孔法を用いて CHO 細胞にトランスフェクトした。細胞は 48 時間後各種実験に使用した。

IV) FACS

細胞は 3.5mM EDTA 加 PBS にて剥離し、1 mM CaCl_2 、1 mM MgCl_2 加 Tyrode-HEPES buffer にて洗浄後一次抗体と 4°C にて 30 分反応させた。洗浄後、二次抗体として RPE-標識ヤギ抗マウス IgG と 4°C にて 30 分反応させた後洗浄し、FACS にて細胞表面上への抗体の結合を測定した。ある実験では 1 mM GRGDS ペプチド添加前後での抗体の結合を測定した。

V) フィブリノーゲン結合実験

フィブリノーゲン (Fbg) は FITC で標識した。まず変異インテグリンを発現した CHO 細胞を抗 β 3 抗体 VNR5-2 と反応させた後、RPE-標識ヤギ抗マウス IgG と反応させた。一部の実験では

細胞を剥離した後 VNR5-2 と反応させる前に 10 mM DTT と 37°C、15 分間反応させた。細胞を 1 mM CaCl_2 、1 mM MgCl_2 または 1 mM MnCl_2 を含む Tyrode-HEPES buffer に resuspend したのち 200 μ g/ml の FITC 標識 Fbg と反応させ、細胞に結合した Fbg 量を FACS で測定した。一部の実験では Fbg とともに活性化抗体である PT25-2 を 10 μ g/ml 添加して行った。この際インテグリンの発現の高い細胞集団 (FL2>500) の領域にゲートを設定し、この領域における FL1 の median fluorescence intensity (MFI) を測定した。

3. 研究結果

I) α Iib β 3 bent conformer は low-affinity conformer である。— α V β 3 結晶構造 (図 1) では β 3 (yellow)



図 1. α V β 3 結晶構造

β A domain の Val332 (orange) と β TD の Ser674 の距離は 3 Å 以下であり、これらのアミノ酸残基を Cys に置換することによってこれらの domain 間にジスルフィド結合を導入することが可能である。CHO 細胞表面に発現した α IIb β 3 を FACS で調べたところ、 α IIb、 β 3 の発現量は V332C、S674C、V332C/S674C とともに wild-type と同等であった (図 2)。すなわち、これらの変異は α IIb β 3 全体の構造に悪影響を与えることなく安定に発現できることがわかった。

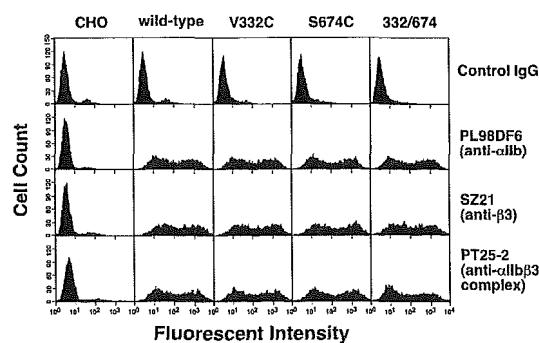


図 2. 変異 α IIb β 3 の発現パターン

次にこれらの α IIb β 3 を発現した細胞へのフィブリノーゲン結合を FACS にて測定した。通常 CHO 細胞上に発現した α IIb β 3 は低親和性で、そのままではフィブリノーゲンに結合することはできない。したがってフィブリノーゲン結合を測定するためには、何らかの方法で α IIb β 3 を活性化する必要がある。図 3 は活性化モノクローナル抗体である PT25-2 存在下での wild-type α IIb β 3 発現細胞へのフィ

ブリノーゲン結合をみたものである。縦軸 (FL 2) に α IIb β 3 発現量、横軸 (FL 1) に FITC 標識フィブリノーゲン結合量をプロットした。PT25-2 非存在下では A のようにフィブリノーゲン結合はほとんどみられない。

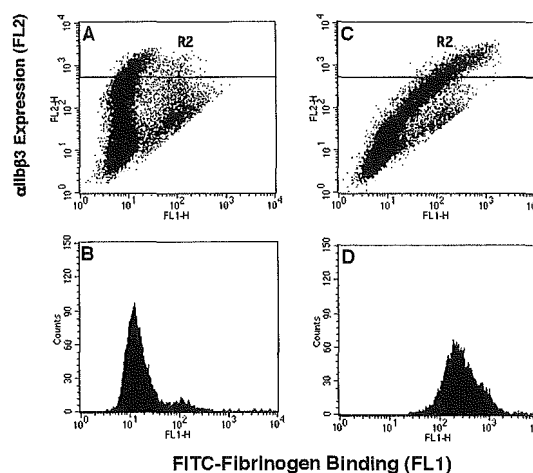


図 3. α IIb β 3 発現 CHO 細胞へのフィブリノーゲン結合

しかし、PT25-2 存在下 (C) では FL 1 右方へのシフトが認められる。B、D はそれぞれにおける FL2 > 500 以上の細胞集団 (R 2 region) へのフィブリノーゲン結合を histogram で表したものである。以下の実験ではこの histogram の MFI をフィブリノーゲン結合量として使用した。

インテグリンはさまざまな細胞内シグナルによって活性化されることが知られている (inside-out signaling)。この inside-out signaling による活性化を mimic するため、細胞内ドメインを欠失した β 3 に各変異を導入した。これらの変異 α IIb β 3 を CHO に発現し、

フィブリノーゲン結合を調べた (solid bar)。Hatchet bar は結合阻害剤である RGD ペプチド存在下でのフィブリノーゲン結合である (図4)。

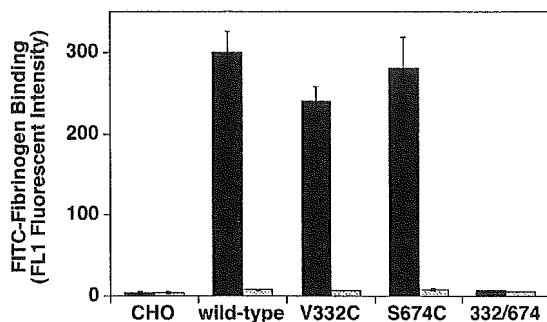


図4. 細胞内ドメイン欠失 α IIb β 3 へのフィブリノーゲン結合

α IIb β 3 を発現しない CHO はフィブリノーゲンを結合しないが、wild-type α IIb β 3 を発現した細胞では結合がみられた。V332C, S674C 単独の変異はフィブリノーゲン結合に大きな影響を与えないことがわかる。これに対して V332C/S674C double mutation は、 α IIb β 3 のフィブリノーゲン結合を完全に阻害した。

α IIb β 3 は細胞外ドメインの構造を直接変化させる活性化抗体によっても活性化させることができる (図5)。

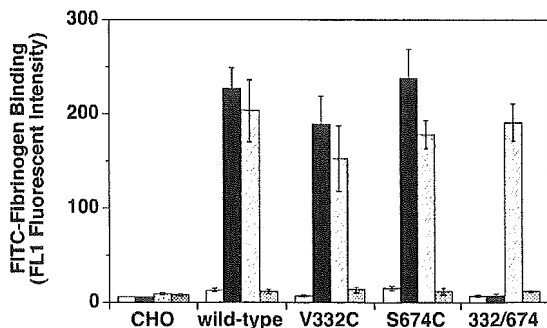


図5. 変異 α IIb β 3 発現 CHO 細胞へのフィブリノーゲン結合

前述したように、細胞内ドメインの intact な α IIb β 3 は不活性であり、そのままではフィブリノーゲンを結合しない (open bar)。活性化抗体 PT25-2 の存在下では wild-type、V332C、S674C はほぼ同等の結合を示したが、V332C/S674C では結合が全く見られなかった (solid bar)。しかし、還元剤である DTT で細胞を処置後、V332C/S674C も wild-type と同等の結合を示した (hatchet bar)。これらの結合は全て RGD ペプチドで阻害された。

α V β 3 結晶構造では β A/ β TD の他に β head (β A, hybrid) と β stalk (tail) (EGF3, EGF4, β TD) の間に広い結合面が形成されており、この間の結合がインテグリンを bent conformer に保っていると考えられる。まず始めに、bent conformer に固定された分子を作成するため、S367C/T551C、G382C/T564C、G388C/R636C を作成した。これらの変異 β 3 は、それぞれ hybrid/EGF3、hybrid/EGF4、hybrid/ β TD の間にジスルフィド結合を形成するように設計されており、いずれの分子も extended conformer にはなり得ないと考えられる (図6)。これらの変異 β 3 を野生型 α IIb とともに CHO 細胞膜上に強制発現させ Fbg との結合を調べたところ、全ての変異 α IIb β 3 は活性化抗体 PT25-2 の存在下でも Fbg を結合せず、DTT 処理でジスルフィド

結合を還元することよってはじめて Fbg を結合した。同様に、 α IIb thigh ドメインと calf-1 ドメインの間にジスルフィド結合を導入し、bent conformer に固定された α IIb β 3 分子も Fbg に対し低親和性であり、DTT 処理をしてジスルフィド結合を還元しない限り Fbg と結合しなかった (データ掲載せず)。

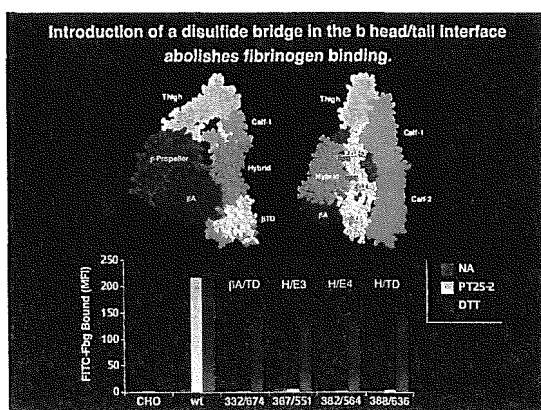


図 6

これらの結果は、ジスルフィド結合を導入する場所にかかわらず、bent conformer に固定された α IIb β 3 は恒に Fbg に対し、低親和性であることを示している。

II) α IIb β 3 extended conformer は high affinity conformer である。——インテグリン extension のリガンド結合活性に与える影響を調べるため、extended conformer に固定した分子を作成した。これらの分子には α IIb genu の直下、genu のやや外側、genu の反対側に N-glycan 結合配列 (N-X-S/T) が導入されている (それぞれ Q595NTT、D538NTT、T478NKT) (図 7)。立体

構造から genu の直下にある Q595 に糖鎖が結合した場合 (Q595NTT)、最も強く α IIb β 3 の extension を誘導すると考えられる。Genu からやや離れた D538 に糖鎖が結合した場合 (D538NTT)、誘導される extension の程度は Q595NTT よりも弱いと予想される。また、genu の反対側に糖鎖が結

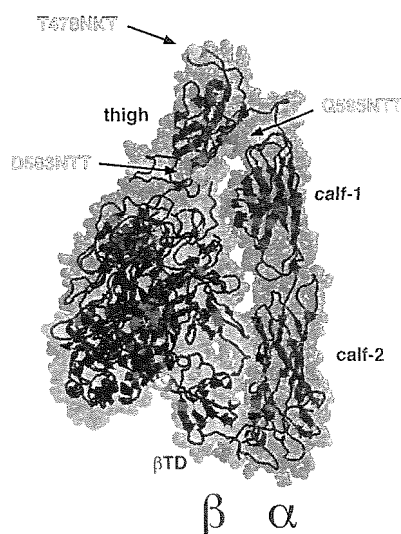


図 7

合した場合 (T478NKT) はインテグリン extension を誘導する作用はほとんど無いと考えられる。野生型 α IIb β 3 を発現した CHO 細胞に比べ、Q595NTT、D538NTT を発現した細胞は PT25-2 による活性化なしに Fbg を結合した。活性化の程度は Q595NTT > D538NTT であった。一方 T478NKT は野生型 α IIb β 3 と同様、PT25-2 で活性化されない限り Fbg を結合しなかった (図 8)。また β A/ β TD 間に N-glycan

結合部位を導入した場合（V332N、S674NGT、V332N/S674NGT）も、野生型 α IIb β 3 に比べ有意な活性化がみられたものの、その作用はごく軽度（<D538NTT）であった（データ掲載せず）。これらの結果は α IIb β 3 の

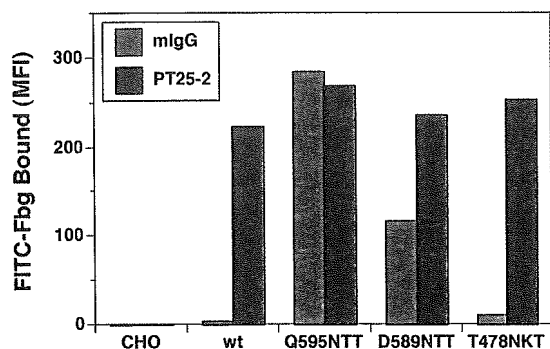


図 8

extended conformer は高親和性レセプターであり、活性化の度合いは extension の度合いに依存する傾向があることを示唆している。

次に α IIb Q595NTT 変異の活性化作用が糖鎖結合によるものか単なる変異によるものかを鑑別するため、Q595 に異なる変異を導入し、その Fbg 結合に与える影響を調べた（図 9）。Q595NTT 以外に Q595NTS が同等の活性化作用を持つ他、ATT、DTT、WTT は有意な活性化作用を持たなかった。

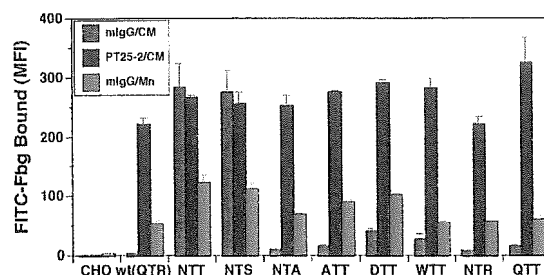


図 9

また、Q595、R597 をそれぞれ単独で N (Q595NTR)、T (Q595QTT) に置換しても活性化は得られなかった。これらの結果は、N-glycan 結合配列である N-X-T/S 以外の配列は α IIb β 3 活性化作用を持たないことを示している。すなわち、Q595NTT の α IIb β 3 活性化作用は変異による構造への直接作用ではなく、N-glycan 結合によるものであると考えられる。

III) Mn^{2+} 応答部位はインテグリンの head 領域ではなく stalk 領域に局在する。—— α V β 3 結晶構造では、 β -propeller ドメインがインテグリンの head 領域を、thigh、calf-1、calf-2 ドメインが stalk 領域を構成する。図 10B に示したように、野生型 α IIb β 3 を発現した CHO 細胞 (α IIb) は PT25-2 存在下 (gray bar) では Fbg と強く結合したが、1 mM Mn^{2+} 存在下 (solid bar) ではわずかな結合しか観察されなかった。これに対し野生型 α V β 3 を発現した CHO 細胞 (α V) は Mn^{2+} 存在下で強く Fbg 結合に結合した。一方 α IIb と α V の stalk 領域を交換したキメラ分子を発現した CHO 細胞では全く逆の現象が観察された。すなわち、 α IIb の β -propeller ドメインと α V の stalk 領域からなるキメラ分子 (B/V) を発現した細胞は Mn^{2+} 存在下で強く Fbg と結合したが、 α V の β -propeller ドメインと α IIb の stalk 領域からなる

分子 (V/B) を発現した細胞と Fbg の結合は著しく減弱していた。これらの結果は、インテグリンの Mn^{2+} 応答部位はインテグリンの head 領域ではなく stalk 領域に局在することを示唆している。

次に、この Mn^{2+} 応答部位をさらに限局するため、図 10A に示したような domain-swapping キメラ分子を作成し、これを発現した細胞への Fbg 結合を調べた。まず始めに高い Mn^{2+} 応答性を示した B/V キメラの stalk 領域の C 末端側から α IIb 配列に戻す操作を行った。この結果、TC1C2 は B/V と同様の Mn^{2+} 応答性を有するが、TC1、T では Mn^{2+} 応答性を欠如することがわかった (図 10C solid bar)。このことは Mn^{2+} 応答性には α V calf-2 ドメインが必要であることを示している。次に Mn^{2+} 応答性が α V calf-2 ドメインだけによるものか否かを確認するため、 α IIb のドメイン配列一つずつを

α V ドメインの配列に交換する操作を行った。この結果 T、C1、D は Mn^{2+} 応答性を欠如するが、C2 は高い Mn^{2+} 応答性をもつことがわかった (図 10D solid bar)。一方、B/V キメラの stalk 領域ドメインの α V 配列を α IIb 配列に戻すと、calf-2 ドメイン配列を α IIb に戻した時のみ (TC1D) Mn^{2+} 応答性が失われることがわかった (図 10E solid bar)。これらの結果は、 β 3 インテグリンの Mn^{2+} 応答部位は細胞膜近傍の calf-2 ドメインに存在することを強く示唆している。インテグリン α 鎖に存在する 5 個の二価イオン結合部位のうち、4 個は head 領域の β -propeller ドメインに、1 個は stalk 領域に局在する。しかしながら、この stalk 領域の二価イオン結合部位は α V の thigh と calf-1 ドメインの間に存在し、calf-2 ドメインには明確な二価イオン結合部位は見られない。

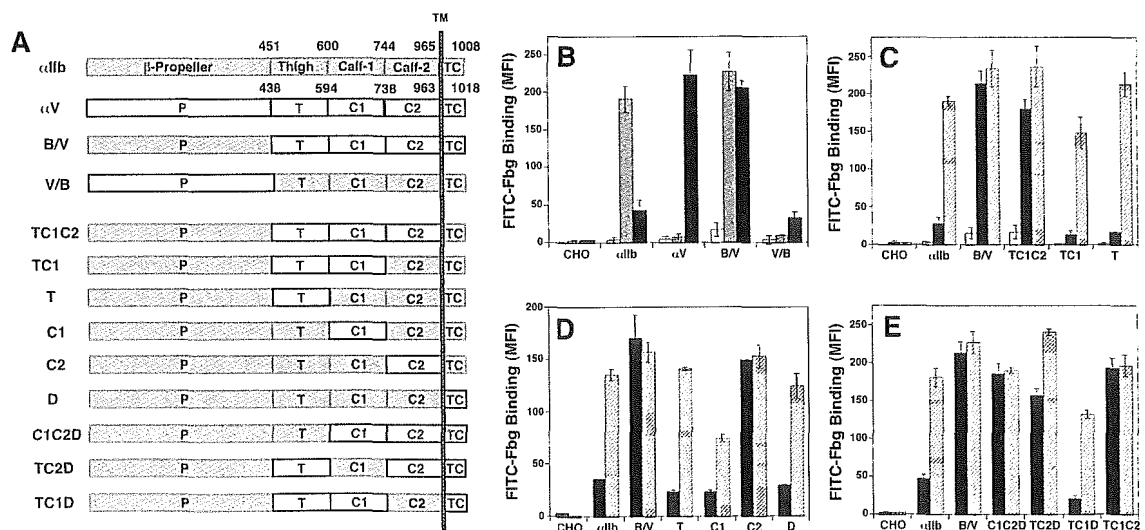


図 10.

この矛盾を解決するため、stalk 領域の二価イオン結合部位を構成する酸性アミノ酸残基 Asp-599 と Glu-636 をそれぞれ Ala に置換し、 Mn^{2+} 存在下での $\alpha V \beta 3$ と Fbg の結合に対する影響を調べた。これらのアミノ酸残基は二価イオン結合のためには必須であり、変異はこの部位への二価イオン結合を阻害すると考えられる。しかしながら、これらの変異は Mn^{2+} 存在下での $\alpha V \beta 3$ への Fbg 結合に全く影響を与えなかった (図 1 1 solid bar)。この結果は、 $\alpha V \beta 3$ の Mn^{2+} 応答部位が calf-2 ドメインに存在することと矛盾しないことを示している。

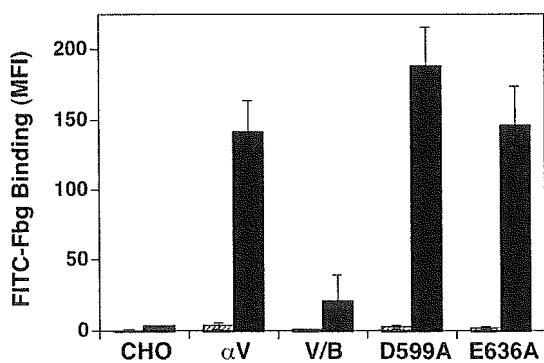


図 1 1

IV) α calf-2/ β EGF4- β TD ドメイン間相互作用はインテグリン活性を調節する。——では、calf-2 ドメインはどのようにして $\alpha V \beta 3$ の Mn^{2+} 応答性に関与しているのだろうか? $\alpha V \beta 3$ 結晶構造 (図 1 2 A) では αV (blue) の calf-2 ドメインと $\beta 3$ (red) の EGF4、 β TD とは密接しており、広い interface を形成していることがわかる。このこ

とは、calf-2/EGF4- β TD ドメイン間 interface の結合の強さの違いが Mn^{2+} 応答性に関与する可能性を示唆している。この仮説を確かめるため、まずこの interface に人工的にジスルフィド結合を導入して calf-2/EGF4- β TD 間の解離がおこらない分子を作成し、Fbg 結合に与える影響を調べた。

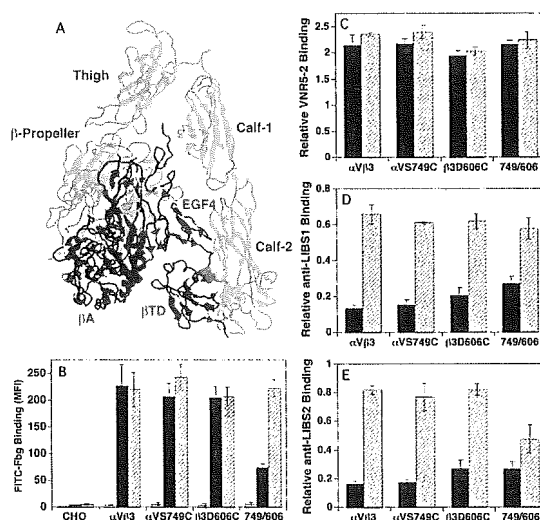


図 1 2

図 1 2 A に示したように、 αV 鎖 calf-2 ドメインのアミノ酸残基 Ser-749 (yellow) と $\beta 3$ 鎖 β TD の Asp-606 (orange) は物理的に近く、これらの残基を同時に Cys 残基に置換することによりジスルフィド結合を導入することが可能である。 αV Ser-749 と $\beta 3$ Asp-606 をそれぞれ単独で Cys に置換した場合 ($\alpha V S749C$ 、 $\beta 3 D606C$)、 Mn^{2+} 存在下 Fbg 結合に大きな影響を与えなかったが、これらの残基を同時に Cys に置換したところ (749/606)、Fbg 結合は野生型 $\alpha V \beta 3$ の約 1/3 に抑

制された (図 1 2 B solid bar)。この抑制効果は細胞を DTT 処理し、ジスルフィド結合を還元化することにより完全に失われた (図 1 2 B hatchet bar)。次にこの α/β 間ジスルフィド結合が $\alpha V \beta 3$ の conformation にあたえる影響を調べた。 $\alpha V \beta 3$ の conformation の変化をモニターするために、各変異 $\alpha V \beta 3$ を発現した CHO 細胞と抗 LIBS 抗体との結合を FACS にて測定した。抗 LIBS 抗体はリガンドと結合したインテグリンと選択的に結合する抗体である。図 1 2 E に抗 LIBS-2 抗体の結合を示す。 αV Ser-749 と $\beta 3$ Asp-606 をそれぞれ単独で Cys に置換した場合 ($\alpha VS749C$, $\beta 3D606C$) は抗 LIBS-2 抗体の結合に大きな変化はみられなかったが、これらの残基を同時に Cys に置換した場合 (749/606) には RGD ペプチド存在下での抗 LIBS-2 抗体の結合 (hatchet bar) に明らかな減少がみられた。抗 LIBS-2 抗体のエピトープは βTD 内にあることが既に報告されている。これらの結果はインテグリン活性化に伴って calf-2/EGF-4- βTD 間の解離がおこることを示唆している。

calf-2/EGF4- βTD 間にジスルフィド結合を導入することにより Mn^{2+} による $\alpha V \beta 3$ の活性化が阻害されることがわかった。では、他の活性化刺激によるリガンド結合への影響はどうであ

ろうか? この問題に答えるために、 $\alpha IIb \beta 3$ の calf-2/EGF4- βTD interface に同様のジスルフィド結合を導入し、活性化抗体と inside-out signaling による Fbg 結合に対する影響を調べた。

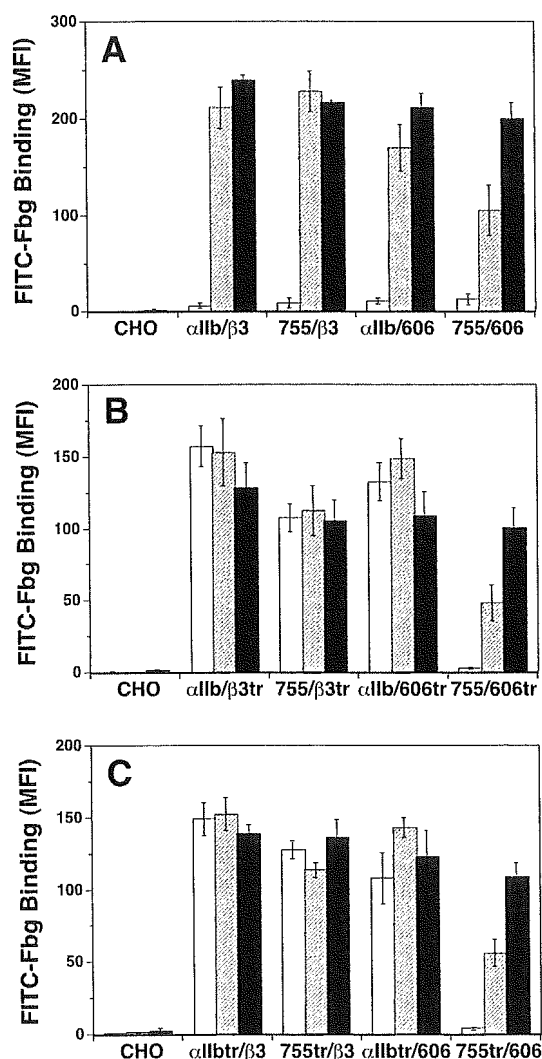


図 1 3

αV Ser-749 に相当する αIIb Phe-755 と $\beta 3$ Asp-606 をそれぞれ単独で Cys に置換した場合 (755/ $\beta 3$, $\alpha IIb/606$)、活性化抗体 PT25-2 によって誘導される Fbg 結合 (図 1 3 A hatchet bar) は野生型 $\alpha IIb \beta 3$ ($\alpha IIb/\beta 3$) に比べ有

意な差は認められなかった。しかし、これらの残基を同時に Cys に置換したところ (755/606)、PT25-2 による Fbg 結合は約 50% 阻害された。この阻害効果は DTT 処理により完全に失われた。次に inside-out signaling によるインテグリン活性化を mimic するために、 α IIb あるいは β 3 の細胞内ドメインを欠如した α IIb β 3 に対する Fbg 結合を調べた。インテグリンの細胞内ドメインを細胞膜直下で欠失させることにより、インテグリンが活性化することは既に報告されており、inside-out signaling を模倣するものと考えられている。図 1 3 B に β 3 細胞内ドメインを欠如した α IIb β 3 に対する Fbg 結合を示す。完全な細胞内ドメインを有する場合と異なり、 β 3 細胞内ドメインを欠如した α IIb β 3 は活性化抗体非存在下でも強く Fbg を結合した (open bar)。この分子内にさらに図 4 A と同じ Cys 変異を導入したところ、 α 鎖、 β 鎖単独の変異 (755/ β 3tr, α IIb/606tr) は大きな影響を与えなかったが F755C/D606C double mutation (755/606) は Fbg 結合を完全に阻害した。この阻害効果は PT25-2 添加によっても完全に中和されなかったが (hatchet bar)、DTT 処理によってはじめて野生型 (α IIb/ β 3tr) と同等の Fbg 結合がみられた (solid bar)。 α IIb 細胞内ドメインを欠失させた α IIb β 3 で

も同様の結果が得られた (図 1 3 C)。V) α IIb/ β 3 stalk の解離は活性化を誘導する。—— α IIb/ β 3 stalk 間の解離を阻害することによって、inside-out signaling による α IIb β 3 活性化が完全に抑制された。では反対に、 α / β stalk を解離させることによって α IIb β 3 を活性化させることができるであろうか？この疑問に答えるため、 α IIb M660 に N-glycan 結合部位を導入した変異 α IIb を作製した。図 1 4 にみられるように M660 (黄色) は α IIb calf-1 と β 3 EGF3 の間に位置しており、この部位に糖鎖結合部位を導入することにより α IIb と β 3 stalk の解離をおこすことが理解できるだろう。

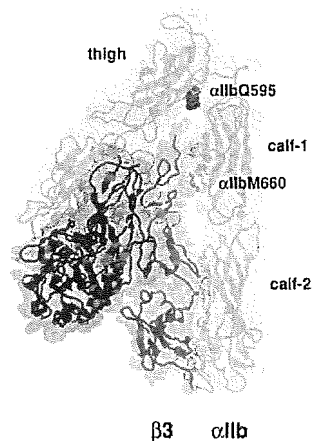


図 1 4

α IIb Q595 (紫) と異なり、M660 に糖鎖を結合させてもインテグリンを直接 extend させる作用は無いと考えられる。Q595NTT と同様に、M660NRT、M660NRS は α IIb β 3 活性化を誘導し

たものの、その他の変異では活性化抗体 PT25-2 非存在下では Fbg 結合がみられなかった (図 1 5)。

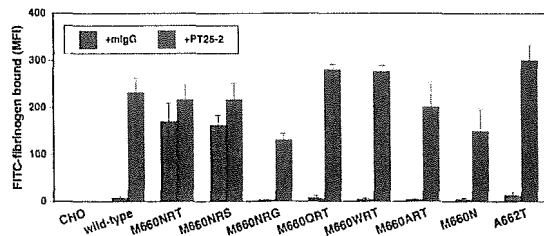


図 1 5

これらの結果は、 α IIb calf-1 と β 3 EGF3 の間が糖鎖の存在によって大きく離れることが α IIb β 3 の活性化を誘導することを示唆している。

結晶構造 (図 1 4) から、 α IIb calf-1 と β 3 EGF3 の距離が開くことによって α IIb calf-2 と β 3 EGF4- β TD の距離も開くことが予想される。 α IIb calf-2 と β 3 EGF4- β TD 間の解離がおこることは inside-out signaling による α IIb β 3 の活性化に必須であった。そこで、 α IIb calf-2 と β 3 EGF4/ β TD 間の結合をジスルフィド結合によって固定化し、 α IIb Q595NTT、M660NRT 変異導入による α IIb β 3 活性化への影響を調べた (図 1 6)。Q595NTT では calf-2/ β 3 EGF4- β TD 間にジスルフィド結合を導入することによって、活性化に大きな影響は見られなかった。これに対し、M660NRT ではジスルフィド結合導入によって活性化が著しく抑制された。これらの結果は、 α IIb β 3 は extended conformer である限り

high-affinity form であり、 α / β stalk 間相互作用の影響は受けないが、 α / β stalk 解離によって誘導される活性化は細胞膜近傍の α / β ドメイン間相互作用が解離する必要があることを示している。

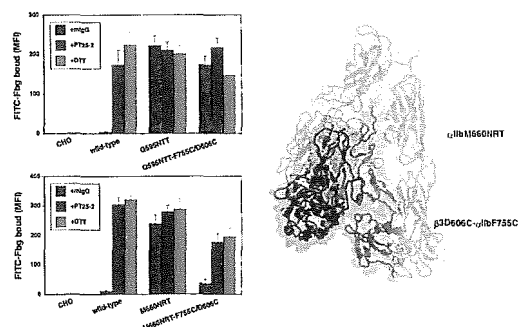


図 1 6

また、M660NRT による活性化は thigh/calf-1 間あるいは β -head/ β -stalk 間にジスルフィド結合を導入してインテグリンの extension を阻害することによって、完全に抑制された (データ記載せず)。これらの結果から、 α / β stalk 解離は bent \rightarrow extended conformer への構造変化を誘導し、 α IIb β 3 を活性化すると考えられる。

4. 考案

本研究では CHO 細胞膜上に発現した遺伝子組換え α IIb β 3 を用い、 α IIb β 3 活性化メカニズムの検討を行った。 α IIb β 3 分子のドメイン間にジスルフィド結合が存在することによって bent conformer に立体構造が固定化さ

れ extended conformer になることが不可能な α IIb β 3 は、導入されたジスルフィド結合の場所にかかわらず全て低親和性を示した。反対に、分子内に N-glycan 結合部位を導入することにより立体構造が extended conformer に固定化された α IIb β 3 は、Fbg に対し非常に高い親和性を示した。興味あることに α IIb β 3 活性化の程度は extension の程度と相関がみられた。これらの結果から、インテグリンが活性化に伴い bent \rightarrow extended conformer に立体構造を変化させるという仮説は正しいと考えられる。しかし、われわれの結果からは bent—extended の中間の conformer も、リガンドに対するある程度の親和性をもつことが予想される。したがって実験条件によっては、bent conformer と高分子リガンドの結合を観察することも可能であろう。

本研究では、 α IIb β 3 と α V β 3 の Mn^{2+} に対する反応性の違いを利用して、 β 3 インテグリンの Mn^{2+} 応答部位が α 鎖の calf-2 ドメインであることを示した。 α V β 3 の結晶構造では、 α 鎖の calf-2 ドメインは二価イオン結合部位を持たないものの、 β 3 鎖の EGF4- β TD と約 700 Å の広い結合面を形成している。考えられる機序として、このドメイン間相互作用がインテグリン活性に影響を与えることが考えられる。実際にこの calf-2/EGF4- β TD

interface をジスルフィド結合によって安定化させると Mn^{2+} による活性化が阻害された。しかしこのジスルフィド結合導入による抑制効果は Mn^{2+} に限らず、活性化抗体、inside-out signaling によるインテグリン活性化をも抑制した。特に inside-out signaling による活性化への抑制効果は著しく、リガンド結合がほぼ完全に阻害された。これらの結果は calf-2/EGF4- β TD 間の相互作用の強さによってインテグリン活性が調節されうることを示唆している。特に inside-out signaling では calf-2/EGF4- β TD interface の解離が必須であると考えられる。

現在のところ inside-out signaling がどのようなメカニズムでインテグリン細胞外ドメインの構造変化を引き起こすのか明らかにされていない。インテグリン細胞内ドメインは約 30~50 アミノ酸残基で構成される。 α IIb 鎖と β 3 鎖の細胞内ドメインは互いに会合しているが、最近、細胞内蛋白質である talin が β 3 の細胞内ドメインに結合すると、この会合が解離して α IIb β 3 の活性化がおこることがわかった。これらの報告および本研究結果を総合すると inside-out signaling によるインテグリン活性化のためには、細胞内 α / β ドメイン間の結合が解離するだけでなく、細胞外の α / β stalk 間の結合が解離する必要があることを意味