

N末端部分のFERM (band 4.1-ezrin-radixin-moesin) ドメインをCHO (Chinese hamster ovarian) 細胞に過剰発現させると $\alpha_{IIb}\beta_3$ が活性化すること、RNA interferenceによりタリンをノックダウンするとCHO細胞のみならずES細胞から分化させた巨核球上 $\alpha_{IIb}\beta_3$ の活性化が障害されることより、タリン結合がインテグリン活性化の最終段階を制御していると考えられる (図4)¹⁵⁾。

iii) リガンド結合部位

Variant型血小板無力症の解析により、 α_{IIb} の β -プロペラドメインあるいは β_3 のI-likeドメインに変異を有する症例が報告されており、これらの部位が $\alpha_{IIb}\beta_3$ の機能部位であることが示されている⁷⁾。

iv) outside-in シグナル

リガンド結合後、 $\alpha_{IIb}\beta_3$ は構造をさらに変化させるとともに $\alpha_{IIb}\beta_3$ のクラスターを形成しoutside-inシグナルを細胞内に伝え、アクチンを含めた細胞骨格タンパクの再構築を誘導し、血小板凝集の増強、血小板の伸展や血餅退縮^{※2}を惹起する²⁾。inside-outシグナルとoutside-inシグナルは全く異なる経路をとるのではなく、一部オーバーラップしている。先に述べた β_3 の細胞内領域のSer752→Pro変異や724番目でtruncateされるvariant型血小板無力症においてはinside-outシグナルのみならず、 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 依存性の細胞伸展などoutside-inシグナルも障害されることが示されている¹⁶⁾。血小板 $\alpha_{IIb}\beta_3$ にFgが結合すると、まずSrcおよびSykが活性化され、その後FAKが活性化されるが、前者の活性化にはアクチンの重合は必要ないのに対し、FAKのリン酸化にはアクチン重合が必要である。つまりSrcやSykの活性化はoutside-inシグナルの初期のシグナルであり、その後PI3 kinaseやRacなどさまざまなシグナル伝達分子をリクルートし、アクチンの再構築をきたしFAKのリン酸化など後期のシグナルを伝達すると考えられる (図5)²⁾¹⁷⁾。その結果、血小板が伸展することによる血流下でのfirm arrestや強固な血小板凝集、血餅退縮を引き起こす。

※2 血餅退縮

試験管内での血液凝固時、凝血塊が収縮し血清が遊離してくる。この凝血塊の収縮を血餅退縮という。 $\alpha_{IIb}\beta_3$ とフィブリンとの結合により血小板が収縮するために生じ、血小板無力症ではこの現象が障害されている。生体内では、血小板の収縮により血栓がより強固になると考えられる。

β_3 インテグリンの細胞内領域にはTyr747とTyr759が存在するが、これらはSrcおよびSykにてリン酸化される。これらのTyrをPheに置換したknock-inマウスでは、 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 活性化 (inside-outシグナル) には異常は認めないが、止血後の再出血傾向や血小板凝集異常や血餅退縮異常を示し、 β_3 のチロシンリン酸化がoutside-inシグナルに重要であることが示されている¹⁸⁾。

■ 血栓性疾患の分子標的としてのインテグリン

インテグリンは種々の病的過程においてきわめて重要な役割を担っているため、疾病制御のための分子標的分子として注目されてきた。インテグリン阻害剤としては、1994年に初めて血小板インテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ に対するヒト・マウスのキメラFab抗体 [Abciximab (ReoPro[®])] が臨床応用され、多少出血の副作用はあるもののその優れた血栓発症予防作用が明らかにされている¹⁹⁾。適応は冠動脈インターベンションおよび急性冠症候群の治療である。特に冠動脈インターベンション後の心血管イベント抑制に対しその有効性が高く、急性冠症候群に対してはその効果が若干劣る。また、 $\alpha_{IIb}\beta_3$ がリガンド側のRGDモチーフを認識しているため、それを基盤として $\alpha_{IIb}\beta_3$ 特異的な低分子阻害薬も開発され臨床応用されている¹⁹⁾。

α_v に関して $\alpha_v\beta_1$ 、 $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_v\beta_5$ 、 $\alpha_v\beta_6$ 、 $\alpha_v\beta_8$ の5種類のインテグリンが存在するが、その中でも $\alpha_v\beta_3$ は血管新生に関与しており、 $\alpha_v\beta_3$ 阻害薬の腫瘍血管新生抑制効果が示されているため、主に抗腫瘍薬として臨床治験が進められている²⁰⁾。マウスモノクローナル抗体 (LM609) からのヒト化抗体としてVitaxin-1、より親和性が高い第二世代のVitaxin-2が開発されている。一方、環状RGDペプチドの誘導体としてCilengitideが開発されている。これらの薬剤は、標準治療に抵抗性の進行癌を対象に臨床試験中である。

一方、 β_2 インテグリンである $\alpha_L\beta_2$ (LFA-1) の阻害抗体efalizumabが開発され、皮膚の自己免疫性疾患である乾癬に対して有効であることが示されている²¹⁾。

おわりに

インテグリンファミリーは細胞膜に存在する双方向へのシグナル伝達分子としてダイナミックな接着現象

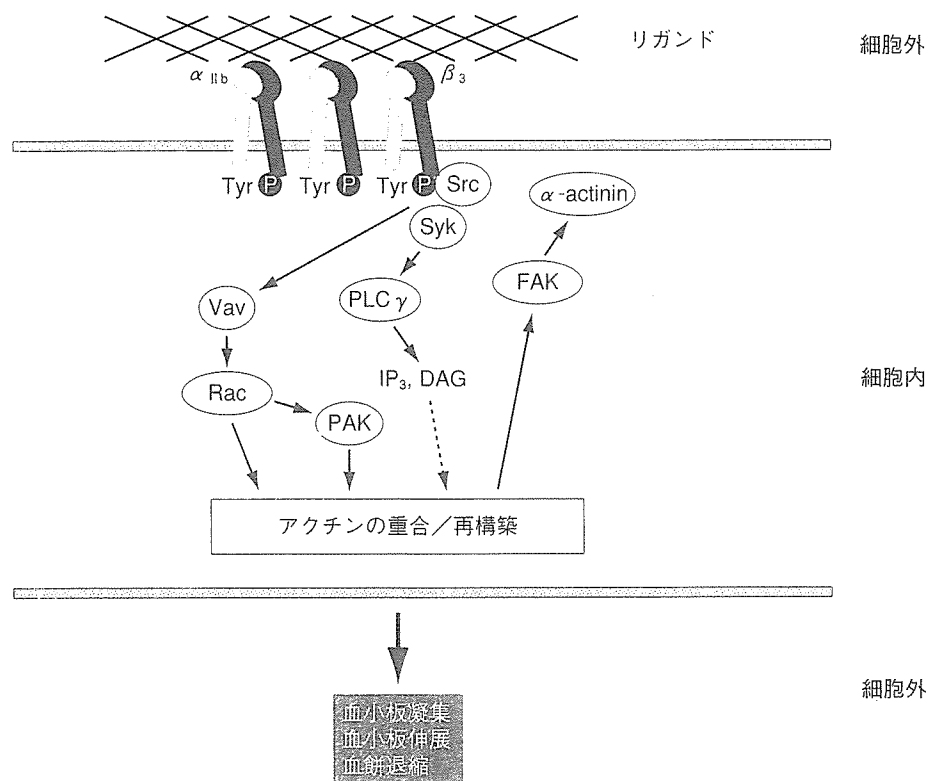


図5 $\alpha_{IIb}\beta_3$ を介した outside-in シグナル

リガンドが結合すると、 $\alpha_{IIb}\beta_3$ はクラスターを形成するとともにシグナルを細胞内に伝え (outside-in シグナル)、アクチンを含めた細胞骨格タンパクの再構築を誘導し、血小板凝集の増強、血小板の伸展や血餅退縮を惹起する

を司り、多岐にわたる病態に関与している。現在のインテグリン阻害薬はインテグリンのリガンド結合部位を直接抑制する薬剤が主流であるが、さらなるインテグリンの機能発現機構とその制御法の解析により、新たな疾患制御法の開発が期待される。

文献

- 1) Hynes, R. O. : Cell, 69 : 11-25, 1992
- 2) Shattil, S. & Newman, P. J. : Blood, 104 : 1606-1615, 2004
- 3) Xiong, J. P. et al. : Science, 294 : 339-345, 2001
- 4) Xiao, T. et al. : Nature, 432 : 59-67, 2004
- 5) Lee, J. O. et al. : Cell, 80 : 631-638, 1995
- 6) George, J. N. et al. : Blood, 75 : 1383-1395, 1990
- 7) 富山佳昭 : 日本血栓止血学会誌, 16 : 171-178, 2005
- 8) Anderson, D. C. & Springer, T. A. : Ann. Rev. Med., 38 : 174-194, 1987
- 9) Savage, B. et al. : Cell, 94 : 657-666, 1998
- 10) Takagi, J. et al. : Cell, 110 : 599-511, 2002
- 11) Eto, K. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99 : 12819-12824, 2002
- 12) Crittenden, J. R. et al. : Nat. Med., 10 : 982-986, 2004
- 13) Chrzanowska-Wodnicka, M. et al. : J. Clin. Invest., 115 : 680-687, 2005
- 14) Chen, Y. P. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89 : 10169-10173, 1992
- 15) Tadokoro, S. et al. : Science, 302 : 103-106, 2003
- 16) Chen, Y. P. et al. : Blood, 84 : 1857-1865, 1994
- 17) Obergfell, A. et al. : J. Cell Biol., 157 : 265-275, 2002
- 18) Law, D. A. et al. : Nature, 401 : 808-811, 1999
- 19) Topol, E. J. et al. : Lancet, 353 : 227-231, 1999
- 20) Tucker, G. C. : Curr. Opin. Investig. Drugs, 4 : 722-731, 2003
- 21) Leibold, M. et al. : N. Engl. J. Med., 349 : 2004-2013, 2003

<著者プロフィール>

富山佳昭 : 1981年大阪大学医学部医学科卒業。内科研修後、同第二内科入局 (血液研究室)。'89年医学博士取得 (垂井清一郎教授) 後、米国南東ウィスコンシン血液センター研究所に留学 (2年間)。2004年より現職。インテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ を中心に血小板無力症や免疫性血小板減少症など血小板の量的・質的異常症の病態解析を行い、さらに血小板インテグリンを中心に血栓・止血分野の基礎的研究を行っている。'03年より Blood の editorial board。

5. アディポサイトカイン と血栓症



大阪大学大学院血液・腫瘍内科講師 富山 佳昭 (Tomiyama, Yoshiaki)
大阪大学大学院内分泌代謝内科学講師 船橋 徹 (Funahashi, Toru)

THROMBOSIS and Circulation



§ 論文のポイント

- [1] メタボリックシンドロームでは、内臓肥満がリスク重積の最上流に存在し、それにより耐糖能異常、高脂血症、高血圧などの病態が引き起こされる。
- [2] 内臓脂肪は PAI-1 を合成、分泌しており、内臓脂肪の増加により PAI-1 濃度が上昇し血栓形成を促進する。
- [3] レプチンは、視床下部のレプチン受容体に結合して食欲制御を担っているが、レプチンは血小板凝集を亢進させ血栓形成を促進する。
- [4] アディポネクチンは、血栓形成に防衛的に作用するため、アディポネクチンが欠損あるいは著減すると血栓傾向に傾く。

§ キーワード

PAI-1 / レプチン / アディポネクチン / 血栓モデル

はじめに

心筋梗塞や脳梗塞など動脈硬化を基盤とした血栓症は、生活習慣病の増加と高齢化に伴い著しく増加しており、本邦のみならず世界の死因の約30%を占めるに至っている。近年心血管病変のきわめて重要なリスクファクターとして「メタボリックシンドローム」が提唱されたが、本シンドロームは、耐糖能異常、高脂血症、高血圧、肥満の異常が重複して存在する病態であり、それぞれの単独の異常に比べ、動脈硬化や血栓症のリスクが急激に増大することが示されている。メタボリックシンドロームの種々の病態は偶然に存在するのではなく、内臓肥満がリスク重積の最上流に存在し、それにより耐糖能異常、高脂血症、高血圧などの病態が引き起こされていると考えられる¹⁾。最近の研究により、脂肪細胞はTNF- α 、レプチン、PAI-1、レジスチン、アディポネクチンといった様々な生理活性物質（これらを総称してアディポサイトカインと呼ぶ）を産生、分泌しており、これらアディポサイトカインの産生異常がメタボリックシンドローム、さらには心血管病変を引き起こす分子基盤を形成していることが明らかとなってきた²⁾。本稿では、アディポサイトカインと血栓症に関しての成績を概説する。

PAI-1

血管内に生じた血栓の溶解反応は、組織型プラスミノゲンアクチベータ

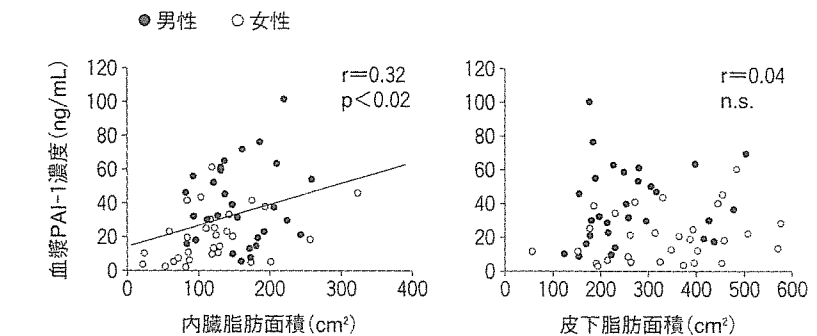


図1 血漿 PAI-1 濃度と脂肪量の相関

血漿 PAI-1 濃度は、皮下脂肪面積とは相関せず、内臓脂肪面積と正の相関を示す。

文献1より改変引用。

(t-PA)により開始される。フィブリン血栓が生じると、フィブリンに t-PA とプラスミノゲンが結合し、局所でプラスミンが産生されフィブリンを分解する。この t-PA の活性を阻害しているのが Plasminogen activator inhibitor (PAI) で、PAI-1 と PAI-2 が知られている。PAI-2 の t-PA 阻害活性はきわめて弱いため、血管内での血栓溶解反応の制御は PAI-1 が主体であり、PAI-1 の増加は線溶活性を低下させ血栓形成を促進する。血中 PAI-1 の増加は、肥満者のみならず心筋梗塞、静脈血栓症、糖尿病患者でも報告されており、また PAI-1 を過剰発現する PAI-1 トランスジェニックマウスでは、後ろ足や尾静脈に血栓が自然発症することより、PAI-1 の増加が血栓を惹起することが明らかである。

筆者らは肥満者の脂肪分布を解析し、血中 PAI-1 値は皮下脂肪面積とは相関しないが、内臓脂肪面積と正相関を示すことを明らかにした(図1)。PAI-1 は血管内皮細胞で合成されるため、広い組織分布を示すが、脂肪前駆細胞である 3T3L1

細胞を用いて PAI-1 遺伝子発現を検討すると、脂肪細胞への分化とともに PAI-1 mRNA 量が増加した。また肥満モデル動物として、満腹中枢である視床下部腹内側核 (VMH) 破壊ラットを用いて内臓脂肪、皮下脂肪における PAI-1 遺伝子の発現と肥満形成過程における発現変化を検討したところ、内臓脂肪、皮下脂肪ともに PAI-1 遺伝子の発現を認めしたが、内臓脂肪では脂肪の蓄積とともにその発現が増加したのに対し、皮下脂肪では変化は認めなかった²⁾³⁾。

以上の成績より、内臓脂肪から直接分泌される PAI-1 が血中レベルに影響を与え、肥満における血管合併症の発症に関与すると考えられる。

レプチン

レプチンは 167 アミノ酸からなる *ob* 遺伝子産物で、視床下部のレプチン受容体に結合して食欲制御を担っていると考えられる。*ob/ob* マウスではレプチンが欠損し肥満になるが、ヒトの肥満ではレプチン欠損

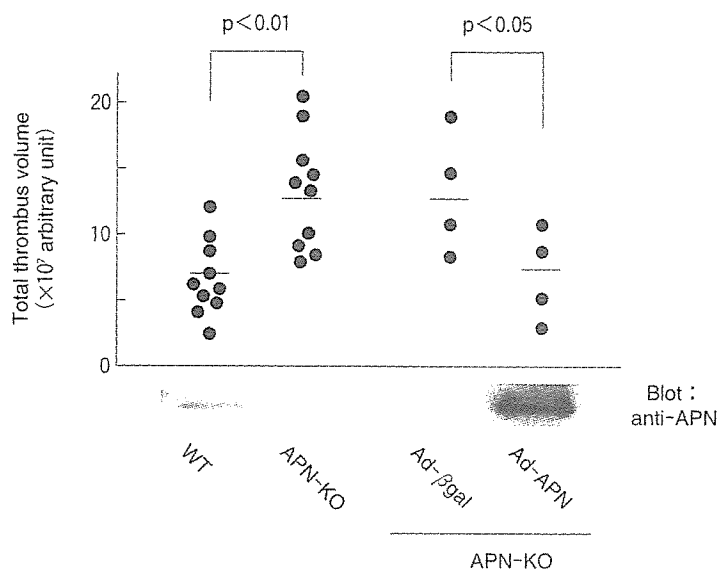


図2 He-Ne レーザー惹起頸動脈血栓モデルでの血栓形成能の解析

アディポネクチン欠損マウスでは血栓形成が遅延しており、この遅延はアディポネクチンの補充で是正された。

WT : wild-type. APN-KO : adiponectin knockout. Ad-βgal : adenovirus-β-galactosidase. Ad-APN : adenovirus-adiponectin

又藤より引用

による肥満はまれで、むしろ肥満度に比例して血中レプチン値が高くなっている。

ob/ob マウスを用いて頸動脈を FeCl₃ により傷害し血栓を誘導すると、*ob/ob* マウスではレプチン欠損により野生型マウスと比較し血栓形成が遅延し、また脆弱になっていることが示された⁴⁾。この血栓形成の遅延と脆弱性は、レプチンを投与することにより改善された。さらに、レプチンは *in vitro* において ADP による血小板凝集を亢進させた。これらの成績より、レプチンは血栓形成に促進的に作用すると考えられる。

アディポネクチン

筆者らは、1995年にヒト脂肪細胞の cDNA ライブラリーから脂肪

細胞特異的蛋白としてアディポネクチン(adiponectin ; APN)を同定し、また、ほぼ同時期にマウスのアディポネクチンも別のグループから報告された。アディポネクチンは C1q ファミリーに属し、244 アミノ酸からなる分泌蛋白で、N 末端側のコラーゲン様ドメインと C 末端側の C1q 様球状ドメインより構成され、血中に 5 ~ 30 μg/mL の濃度で存在している。興味深いことに、アディポネクチンは脂肪細胞特異的に産生・分泌されるが、BMI (body mass index) とは逆相関を示す。つまり、肥満になり脂肪量が増加すると、アディポネクチンの血中濃度は低下する。この機序の詳細は明らかではないが、TNF-α とアディポネクチンは互いに他の産生を転写レベルで抑制するため、肥満により

TNF-α が増加しアディポネクチンの血中濃度が低下すると考えられている⁵⁾。

アディポネクチンと疾患との関連であるが、アディポネクチン濃度は BMI にて変動するため、年齢および BMI を一致させて検討すると、糖尿病患者や冠動脈疾患において血中アディポネクチン濃度が低下していることが明らかとなった⁵⁾⁶⁾。実際、アディポネクチン欠損マウスを用いた研究にて、アディポネクチンには抗糖尿病作用および抗動脈硬化作用があることが示されている⁷⁾⁸⁾。アディポネクチン欠損マウスは、普通食餌では糖尿病などの代謝異常を呈さないが、高脂肪/高シヨ糖食餌で飼育すると糖尿病を発症し、その機序としては、アディポネクチン欠損によりインスリン抵抗性になることが明らかにされている⁹⁾。言い換えると、アディポネクチンにはインスリン感受性を高める作用がある。またアディポネクチンは、血管平滑筋の増殖抑制、単球/マクロファージの機能抑制、血管内皮における接着分子発現の低下など、種々の作用により抗動脈硬化作用を発揮する¹⁰⁾。

上記のように、アディポネクチンは抗糖尿病作用、抗動脈硬化作用を有するが、筆者らは急性の血栓症発症に関してアディポネクチンの影響を検討した⁹⁾。普通食餌で飼育した若齢(10 ~ 12 週齢)のアディポネクチン欠損マウスを用いて He-Ne レーザー惹起頸動脈血栓モデルにて解析した。使用したアディポネクチン欠損マウスには動脈硬化病変はなく、代謝系もほぼ正常であり、血小

板数や止血系のパラメーターも正常であった。興味深いことに、アディポネクチン欠損マウスでは、レーザーによる血栓形成が野生型マウスに比べ亢進しており、さらにこの亢進はアデノウイルスベクターを用いてアディポネクチンを補充することにより改善された(図2)。つまり、アディポネクチンが欠損あるいは著減すると易血栓性になると考えられる。

血栓形成に関してのアディポネクチンの作用をさらに検討するため、コラーゲンを固相化したプレート上に全血を一定速度で流し、流動条件下での血栓形成過程をリアルタイムで解析した。その結果、アディポネクチン欠損マウスでは、*ex vivo*の血栓形成能が亢進していることが示された(図3)。さらに血小板凝集能を検討すると、アディポネクチン欠損マウス血小板では野生型マウス血小板に比べ、血小板凝集能が亢進していた。*ex vivo*の実験では内皮細胞機能は関与しないため、アディポネクチンが直接血小板機能を抑制し、血栓形成に対して防衛的に作用することが示された。

次に、アディポネクチンを野生型マウスに過剰発現させ、He-Neレーザー惹起頸動脈血栓モデルにて解析すると、アディポネクチン欠損マウスのみならず野生マウスにおいても血栓形成が抑制された。このことより、アディポネクチンの抗血栓剤としての可能性が示唆された(図4)⁹⁾。

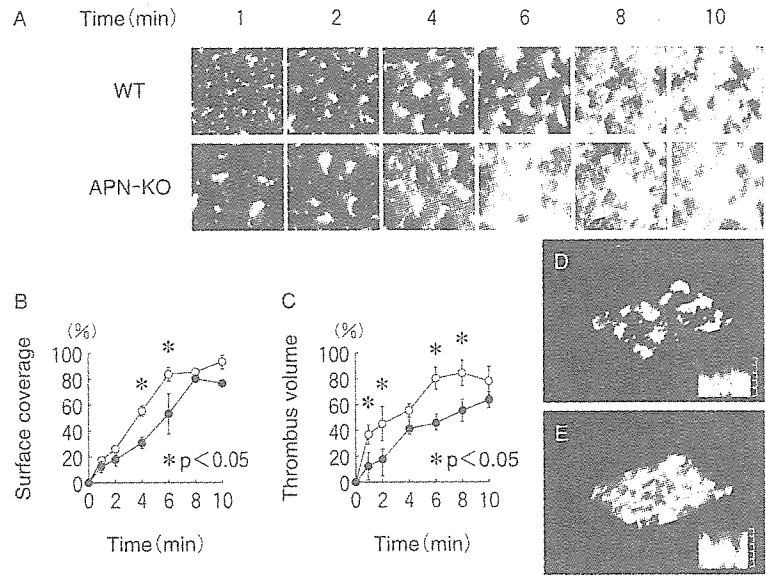


図3 流動条件下でのコラーゲン上での血栓形成能の解析

マウスより全血を採取し流動下で解析すると、アディポネクチン欠損マウス由来の全血での血栓形成能が亢進していた。

● : 野生型マウス
○ : アディポネクチン欠損マウス
血栓の二次元イメージ D : 野生型 E : アディポネクチン欠損マウス
WT : wild-type APN-KO : adiponectin knockout

(文獻9より引用)

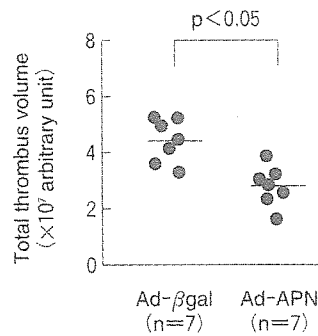


図4 アディポネクチンの抗血栓作用

野生型マウスにアディポネクチンを過剰発現させ、He-Neレーザーにより惹起される頸動脈血栓形成が抑制された。

Ad-βgal : adenovirus-β-galactosidase Ad-APN : adenovirus-adiponectin

(文獻9より改変引用)

結語

脂肪細胞は、アディポネクチンに代表されるように種々のアディポサ

イトカインを産生し、糖尿病や動脈硬化、さらには血栓症の発症に関与していることが分子レベルにて明らかとなってきた。適度な運動や食事による体重減少により、PAI-1やア

ディポネクチンの異常が是正される
ことが示されており, 心血管病変の
リスクを改善し得る. メタボリック
シンドロームの提唱は, これらのリ
スクファクターの早期発見と疾病発
症予防に大きく貢献するものと考え
られる.

謝 辞

He-Ne レーザー惹起頸動脈血栓
モデルでの解析は, 神戸学院大学栄
養学病室ハイテクリサーチセンター
の山本順一郎教授との共同研究であ
り, 研究の一部は神戸学院大学学術
フロンティア推進事業より助成を受
けた.

References

1) Matsuzawa Y, Funahashi T, Kihara

S, et al : Adiponectin and meta-
bolic syndrome. *Arterioscler
Thromb Vasc Biol* 24 : 29-33,
2004

2) Shimomura I, Funahashi T, Taka-
hashi M, et al : Enhanced expres-
sion of PAI-1 in visceral fat : pos-
sible contributor to vascular dis-
ease in obesity. *Nat Med* 2 :
800-803, 1996

3) 富山佳昭, 船橋徹, 松澤佑治 : 全
身性疾患と出血および血栓傾向.
肥満. *Modern Physician* 20 :
903-906, 2000

4) Konstantinides S, Schafer K,
Koschnick S, et al : Leptin-
dependent platelet aggregation
and arterial thrombosis suggests
a mechanism for atherothrombotic
disease in obesity. *J Clin Inves*
108 : 1533-1540, 2001

5) Hotta K, Funahashi T, Arita Y, et
al : Plasma concentrations of a
novel, adipose-specific protein,

adiponectin, in type 2 diabetic
patients. *Arterioscler Thromb
Vasc Biol* 20 : 1595-1599, 2000

6) Pischon T, Girman CJ, Hotamislig-
il GS, et al : Plasma adiponectin
levels and risk of myocardial
infarction in men. *JAMA* 291 :
1730-1737, 2004

7) Maeda N, Shimomura I, Kishida K,
et al : Diet-induced insulin resist-
ance in mice lacking adiponectin/
ACRP30. *Nat Med* 8 : 731-737,
2002

8) Matsuda M, Shimomura I, Sata M,
et al : Role of adiponectin in pre-
venting vascular stenosis. *J Bio
Chem* 277 : 37487-37491, 2002

9) Kato H, Kashiwagi H, Shiraga M,
et al : Adiponectin acts as an
endogenous antithrombotic factor.
Arterioscler Thromb Vasc Biol
26 : 224-230, 2006