シンポジウム 5 動脈硬化進展における血栓の意義—臨床病理から分子メカニズムまで

血栓形成と β_3 インテグリン¹富山 佳昭²

はじめに

インテグリンは細胞と細胞外基質および細胞—細胞間の接着をつかさどる接着分子の一つであり、 α 鎖と β 鎖の異なる 2 つのサブユニットよりヘテロダイマーを構成し、一般的に $\alpha_x\beta_y$ という形で表現される。細胞は接着現象を介して、その周囲の細胞外基質ならびに細胞間相互作用により生じる情報に対応し、その機能をダイナミックに変化させており、インテグリンを介した細胞接着は個体の発生過程、免疫反応、組織修復、炎症反応、癌の転移、動脈硬化の発症・進展、生理的な止血や病的血栓形成といったさまざまな生理的あるいは病的過程における中核をなしていることが明らかにされている¹⁾。

インテグリンのなかでも、 β_3 インテグリン ($\alpha_{IIb}\beta_3$ と $\alpha_v\beta_3$) は血管病変や血栓形成の中核をなしており、 $\alpha_{IIb}\beta_3$ の欠損症は先天性血小板機能異常症である血小板無力症として知られており、この接着分子の血小板における重要性は明らかである²⁾。

本稿では β_3 インテグリン ($\alpha_{IIb}\beta_3$ と $\alpha_v\beta_3$) に焦点を絞り、その構造と機能に関して考察する。

I. β_3 インテグリンの構造

$\alpha_{IIb}\beta_3$ は血小板/巨核球系に特異的に発現し、血小板あたり約 80,000 分子と最も豊富に存在する接着分子である。 $\alpha_{IIb}\beta_3$ はフィブリノーゲン (Fg), von Willebrand 因子, フィブロネクチン, ビトロネクチンのレセプターとして機能し、 $\alpha_{IIb}\beta_3$ とこれらの接着性蛋白との結合の一部はリガ

ンド側に存在する Arg-Gly-Asp (RGD) 配列を介していることが明らかにされている。Fig. 1 に $\alpha_{IIb}\beta_3$ の模式図を示しているが α_{IIb} と β_3 は 1:1 の比率で Ca イオン依存性の複合体を形成しており、 α_{IIb} (約 140 kDa: 1,008 個のアミノ酸残基よりなる) は heavy chain (約 125 kDa: 859 残基) と light chain (約 22 kDa: 149 残基) より構成されており、heavy chain には 4 つの Ca 結合ドメインが存在している。もう一つの β_3 インテグリン、 $\alpha_v\beta_3$ は、血管内皮や血管平滑筋、単球・マクロファージなどに発現しており、血管新生や血管平滑筋の血管内膜への遊走に関与し、動脈硬化の発症・進展に重要な役割を果たしている⁴⁾。 α_v と α_{IIb} とはアミノ酸レベルで約 34% のホモロジーを有している。

一方、 β_3 (約 90 kDa: 762 アミノ酸残基) には cysteine-rich 領域が存在し N 末端側の Cys5 と cysteine-rich 領域の Cys435 が結合しており、大きなループ構造を形成していると考えられている。また β_3 の残基 118-131 にも Ca イオン結合部位が存在すると考えられている。

インテグリンではいずれのサブユニットもそのほとんどが細胞外領域から構成されており、細胞内領域は短く、それぞれ α_{IIb} が 20 残基、 α_v が 32 残基、 β_3 が 47 残基より構成されているのみでありキナーゼドメインは存在しない。

II. $\alpha_{IIb}\beta_3$ の機能発現機構

血小板は血管内を血栓を形成することなく循環しているが、血管内皮が障害され剥離や脱落をおこすと、血小板は、粘着→扁平および伸展化→血小板凝集塊の形成、という過程を経て一次止血を完成させる³⁾。血小板無力症 (Glanzmann thrombasthenia) では先天的に $\alpha_{IIb}\beta_3$ が欠損 (もしくは機能不全=Variant 型) しており、幼少時より皮膚粘膜出血を中心とした出血傾向を呈するため、このインテグリンが血小板機能において重要であることは容易に理解できる²⁾。一連の血栓形成過程において、血小板無力症の血小板では、血小板粘着後の扁平、伸展化の低下や血小板凝集塊形成が欠如することが、perfusion chamber を用いた実験により示されている。また血小板凝集検査において、

¹ 1999 年 11 月, 平成 11 年度日本動脈硬化学会冬季大会 (大阪) において発表。

² 大阪大学大学院医学研究科分子制御内科学 (第二内科) Thrombosis and β_3 integrins
Yoshiaki Tomiyama: Department of Internal Medicine and Molecular Science, Graduate School of Medicine, Osaka University

Key words: Platelets, Atherosclerosis, Ligand binding, β -propeller model

原稿受取日: 2000 年 3 月 30 日

Fig. 1 $\alpha_{IIb}\beta_3$ の構造. α_{IIb} と β_3 は Ca イオン依存性に 1:1 の複合体を形成している. 図中の Ca^{2+} は Ca イオン結合部位を示している. 破線は現在考えている Fg 結合部位.

血小板無力症では ADP やコラーゲンなどで惹起される Fg 依存性の血小板凝集がすべて欠如している²⁾. 以上のように, $\alpha_{IIb}\beta_3$ は血小板と血小板の細胞間接着現象である血小板凝集に必要不可欠な分子である.

血小板は $\alpha_{IIb}\beta_3$ をつねに表面に発現しているにもかかわらず, 正常血管内で凝集することはない. このことは, *in vitro* において非活性化状態の血小板は液相の Fg を結合しないが, ADP などで活性化させた血小板では Fg を結合するように変化する, という成績と対応している. つまり, $\alpha_{IIb}\beta_3$ の機能がアゴニストの刺激により変化する訳である. 最近, 血栓形成過程において $\alpha_{IIb}\beta_3$ の構造は Fig. 2 のようにダイナミックに変化しており, 血小板内外にさまざまなシグナルを伝達し, 血小板機能を調節していることが明らかになってきた. $\alpha_{IIb}\beta_3$ がそのレセプター機能を発現するためには, 1) $\alpha_{IIb}\beta_3$ の活性化, 2) Fg 結合, 3) Fg 結合後の変化, の少なくとも三つの過程が必要であると考えられている³⁾. 非活性化血小板上の $\alpha_{IIb}\beta_3$ は, Fg と異なり, RGD ペプチドなどの小さなリガンドは結合しうするため, Fig. 2 に示しているようなポケットが想定されており, アゴニストによる血小板内から外への inside-out シグナルにより, $\alpha_{IIb}\beta_3$ が機能部位が構造変化し ($\alpha_{IIb}\beta_3$ の活性化) Fg が結合するようになると考えられている. 一方, $\alpha_{IIb}\beta_3$ は Fg 結合によりさらに構造変化し, LIBS (ligand-induced

Fig. 2 $\alpha_{IIb}\beta_3$ の機能発現過程. $\alpha_{IIb}\beta_3$ は通常 resting 状態にあり Fg などのリガンドを結合しない. アゴニスト刺激により生じた inside-out シグナルにより $\alpha_{IIb}\beta_3$ が構造変化し活性化型となりリガンドを結合するようになる. リガンドが結合すると $\alpha_{IIb}\beta_3$ はさらに構造を変化させるとともに, 細胞内への outside-in シグナルを生じ, 血小板の扁平, 伸展化や血餅退縮を生じると考えられる.

binding sites) を発現するとともに血小板外から内への outside-in シグナルを生じ, 細胞骨格蛋白の再構築をもたらす, 血小板の伸展や血小板凝集をひきおこすと考えられている.

III. $\alpha_{IIb}\beta_3$ の構造—機能連関

$\alpha_{IIb}\beta_3$ のリガンド結合部位は, 合成ペプチドや variant 型血小板無力症の解析により詳細に検討されている. RGD ペプチドを用いた架橋実験などの解析により, RGD の認識部位は β_3 上では N 末端よりアミノ酸 109-171 番目または 211-222 番目の領域に存在すると考えられていた. 事実, variant 型血小板無力症の解析にて 119 番の Asp の Tyr への変異や 214 番の Arg の Trp や Gln への変異にて $\alpha_{IIb}\beta_3$ のリガンド結合能が失われることが示されている. 最近イ

A.

N-terminal portion of the α subunit containing seven β -sheets

B.

Fig. 3 β -プロペラモデル (Springer TA, 1997⁷⁾). $\alpha_{11b}\beta_3$ など I-domain を有さないインテグリン α 鎖の N 末端部分の予想される構造。A: 予想される二次構造と W3 4-1 ループと W3 2-3 ループ。B: β -プロペラモデル (上からの図)。

ンテグリン $\alpha_M\beta_2$ の機能部位である I-ドメインの三次構造がはじめて明らかにされ、MIDAS ドメイン (metal ion-dependent adhesion site) が 2 価イオン (この場合 Mg^{2+}) の結合およびリガンド結合に重要であることが明らかにされた⁶⁾。MIDAS ドメインには Asp X Ser (DxSxS: x はどのアミノ酸でも可) 配列が保存されているが、 $\alpha_{11b}\beta_3$ には I-ドメインは存在しないものの β_3 のアミノ酸 119-123 番に DxSxS 配列が存在し、110-210 番のアミノ酸は MIDAS ドメインと相同性が高いことが示された⁶⁾。さきに示した 119 番の Asp の変異に起因する血小板無力症の存在より、 β_3 の DxSxS 配列の重要性は明らかである。

一方、 α_{11b} や α_5 などでは I-ドメインは存在せず、リガンド結合部位として 2 番目の Ca^{2+} 結合ドメインが重要であるとの報告がなされていた。Springer は、non-I ドメイン α 鎖においてこの 7 回の繰り返し構造は、phosphatidylinositol phospholipase D や G 蛋白の β サブユニットなどで認められる β プロペラ構造をとり、リガンド

結合部位として機能していると予測した (Fig. 3)⁷⁾。この構造において、機能部位はプロペラの上面に存在するとされ、一方 Ca 結合ドメインは下面に存在する。最近、筆者らは α_{11b} の変異による variant 型血小板無力症症例をはじめて明らかにし、 α_{11b} 上のリガンド結合部位として 2 番目の Ca^{2+} 結合ドメインではなく、さらに N 末端部分で W3 4-1 ループ内の Asp 163 が重要であることを明らかにした⁸⁾。また W3 2-3 ループも重要であると考えられ⁹⁾、 β プロペラ構造を支持する成績である。

β_3 インテグリン活性化に関して、最近、筆者らは恒常的に β_3 インテグリンが活性化している変異株の作製に成功し、 β_3 の cysteine-rich 領域内の Thr 562 $\rightarrow$ Asn の変異により $\alpha_{11b}\beta_3$ および $\alpha_v\beta_3$ が活性化することを明らかにした。この成績は β_3 インテグリンは構造変化により活性化型に変化することを示し、さらに cysteine-rich 領域の重要性を示している¹⁰⁾。この構造変化は α_{11b} および β_3 の細胞内領域を介して inside-out シグナルが $\alpha_{11b}\beta_3$ を活性化させると考えられるが¹¹⁾、その詳細は依然不明である。 $\alpha_{11b}\beta_3$ の細胞内領域は短くキナーゼドメインも存在しないため、これらに会合する分子を介して inside-out シグナルが伝達されると考えられる。

最近、 β_3 の細胞内領域に結合する新規蛋白 β_3 -endonexin がクローニングされたが、興味深いことに β_3 -endonexin を $\alpha_{11b}\beta_3$ を発現させた CHO 細胞に過剰発現させると $\alpha_{11b}\beta_3$ が活性化することが示されている¹²⁾。一方、筆者らは Na^+/Ca^{2+} exchanger が $\alpha_{11b}\beta_3$ 活性化の inside-out シグナルに関与しているとの成績を得ており、現在さらに解析中である^{13,14)}。

おわりに

$\alpha_{11b}\beta_3$ を含む β_3 インテグリンは止血・血栓の中核を担う接着分子であり、c7E3 Fab (abciximab; ReoPro^{TM}) で代表されるように、この接着分子をターゲットとした治療により、PTCA 術後の冠動脈の急性再狭窄さらには術後 6 カ月間における再狭窄が有意に抑制されるなど、良好な成績が得られている¹⁵⁾。 β_3 インテグリンの機能発現機構の詳細な解析は、インテグリンファミリーのよりよい制御法の開発に寄与すると確信する。

文 献

- 1) Hynes RO: Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. Cell, 69: 11-25, 1992
- 2) 富山佳昭: 血小板膜糖蛋白異常症. 臨床医, 25: 24-28, 1999
- 3) 富山佳昭: 血栓形成における接着分子. 臨床病理, 特 102: 153-163, 1996
- 4) Byzova TV, Rabbani R, D'Souza SE, and Plow EF:

- Role of integrin $\alpha_v\beta_3$ in vascular Biology. *Thromb Haemost*, 80 : 726-734, 1998
- 5) Ginsberg MH, Frelinger AL, Lam SC-T, Forsyth J, McMillan R, Plow EF, and Shattil SJ : Analysis of platelet aggregation disorders based on flow cytometric analysis of membrane glycoprotein IIb-IIIa with conformation-specific monoclonal antibodies. *Blood*, 76 : 2017-2023, 1990
  - 6) Lee J-O, Rieu P, Arnaout MA, and Liddington R : Crystal structure of the A domain from the α subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell*, 80 : 631-638, 1995
  - 7) Springer TA : Folding of the N-terminal, ligand-binding region of integrin α -subunits into a β -propeller domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94 : 65-72, 1997
  - 8) Honda S, Tomiyama Y, Shiraga M, Tadokoro S, Takamatsu J, Saito H, Kurata Y, and Matsuzawa Y : A two-amino acid insertion in the Cys 146-Cys 167 loop of the α_{IIb} subunit is associated with a variant of Glanzmann thrombasthenia : critical role of Asp 163 in ligand binding. *J Clin Invest*, 102 : 1183-1192, 1998
  - 9) Kamata T, Irie A, Tokuhira M, and Takada Y : Critical residues of integrin α_{IIb} subunit for binding of $\alpha_{IIb}\alpha_3$ (glycoprotein IIb-IIIa) to fibrinogen and ligand-mimetic antibodies (PAC-1, OP-G2, and LJ-CP3). *J Biol Chem*, 271 : 18610-18615, 1996
  - 10) Kashiwagi H, Tomiyama Y, Tadokoro S, Handa S, Shiraga M, Mizutani H, Handa M, Kurata Y, Matsuzawa Y, and Shattil SJ : A mutation in the extracellular cysteine-rich repeat region of the β_3 subunit activates integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ and $\alpha_v\beta_3$. *Blood*, 93 : 2559-2568, 1999
  - 11) O'Toole TE, Katagiri Y, Faull RJ, Peter K, Tamura R, Quaranta V, Loftus JC, Shattil SJ, and Ginsberg GH : Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction. *J Cell Biol*, 124 : 1047-1059, 1994
  - 12) Kashiwagi H, Schwartz MA, Eigenthaler M, Davis KA, Ginsberg MH, and Shattil SJ : Affinity modulation of platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ by β_3 -endonexin, a selective binding partner of the β_3 integrin cytoplasmic tail. *J Cell Biol*, 137 : 1433-1443, 1997
  - 13) Shiraga M, Tomiyama Y, Honda S, Kashiwagi H, Kosugi S, Handa M, Ikeda Y, Kanakura Y, Kurata Y, and Matsuzawa Y : Affinity modulation of the platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ by α -chymotrypsin : a possible role for Na^+/Ca^{2+} exchanger. *Blood*, 88 : 2594-2602, 1996
  - 14) Shiraga M, Tomiyama Y, Honda S, Suzuki Kosugi S, Tadokoro S, Kanakura Y, Tanoue K, Kurata Y, and Matsuzawa Y : Involvement of Na^+/Ca^{2+} exchanger in inside-out signaling through the platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. *Blood*, 92 : 3710-3720, 1998
  - 15) Collier BS : Platelet GPIIb-IIIa antagonists : the first anti-integrin receptor therapeutics. *J Clin Invest*, 99 : 1467-1471, 1997