◆総説◆

インテグリン活性化とその制御 ～腫瘍細胞のコントロールにむけて～

加藤 恒^{*1}, 富山佳昭^{*2}

加藤 恒

Regulation of integrin activation—the role of integrin activation in tumor metastasis

Hisashi KATO^{*1}, Yoshiaki TOMIYAMA^{*2}

平成7年3月 大阪大学医学部卒業
平成17年3月 大阪大学大学院医学系研究科分子病態医学 博士課程卒業
同年10月 カリフォルニア大学サンディエゴ校血液・腫瘍科 研究員 (Sanford J. Shattil 研究室)
平成24年11月 大阪大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科

Key words: integrin, inside-out signal, metastasis

1. はじめに

生命の発生・器官形成にはじまり、正常な生命活動を維持するための様々な免疫反応や組織修復などに加え、炎症反応、血栓形成、腫瘍形成・転移など様々な疾患にいたるまでほぼすべての細胞現象にインテグリンは関与している。αサブユニットとβサブユニットのヘテロ二量体から形成されるインテグリンは膜貫通型の受容体として幅広い細胞に発現し、細胞外領域で細胞周囲に存在するフィブロネクチンやコラーゲンなどのリガンドと結合し、そのシグナルは巨大な細胞外領域に比べ極端に小さな細胞内領域を介して細胞内へ伝達され、細胞周囲の環境に応じた細胞の遊走、増殖などの意思決定を行っていく。以前より様々な疾患におけるインテグリンの役割が注目され、疾患の治療を目的とした抗インテグリン療法の開発が行われてきたが現段階では期待に応えられる成果が得られているとは言えない。本総説では現在考えられている抗インテグリン療法の持つ課題とともに、筆者らが行った腫瘍の転移形成過程における腫瘍細胞上のβ1インテグリン活性化の重要性を示唆するデータを紹介し、インテグリン

活性化制御をターゲットとした新たな抗インテグリン療法の可能性について考察したい。

2. インテグリンの構造、活性化

よく知られているようにインテグリンは18種類のαサブユニットと8種類のβサブユニットの組み合わせからできるヘテロ二量体で、膜貫通型受容体として幅広い細胞に発現している。現在24種類のインテグリンが知られており、それぞれのインテグリンは異なるリガンドと結合し、様々な細胞現象に関与している(図1A)。インテグリンでユニークなのは、リガンドとの結合がインテグリンの活性化状態により規定されているという点である。非活性化状態にあるインテグリンにリガンドは結合しないが、細胞がアゴニストによる刺激を受けるとinside-outシグナルが惹起され、これによりインテグリンは活性化しリガンドの結合が可能となる¹⁾。このinside-outシグナルにおいて最も重要で各インテグリン活性化に共通して必要な分子がTalinであり、βインテグリン細胞内領域に直接結合しインテグリン活性化を誘導することが知られている^{2) 3)}。Talin ととも

^{*1} 大阪大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科 [〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2 (C9)]
Osaka University Graduate School of Medicine, Department of Hematology-Oncology
[2-2 (C9) Yamadaoka, Suita, Osaka, 565-0871, Japan]
Tel: 06-6879-3871 Fax: 06-6879-3879 e-mail: hisashi@hp-blood.med.osaka-u.ac.jp

^{*2} 大阪大学医学部附属病院輸血部

図1 インテグリンと inside-out 活性化シグナル

A) 細胞表面に発現する接着分子インテグリンは α 鎖と β 鎖の二つのサブユニットから形成されるヘテロダイマーで、18種類の α サブユニットと8種類の β サブユニットから成る24種類のインテグリンが知られている。

B) 非活性化状態のインテグリンは折れ曲がった「bent」構造を取っているが、細胞がアゴニストなどによる刺激を受けると inside-out シグナルが惹起され、Talin や Kindlin が β サブユニットの細胞内領域にリクルートされる。Talin, Kindlin が β サブユニット細胞内領域に結合するとインテグリンは活性化状態となりリガンドの結合が可能になる。この時インテグリンは構造変化を伴い、細胞外領域は起き上がり「extended」構造を取るようになる。

に β インテグリン細胞内領域に結合する Kindlin もインテグリン活性化に重要であるが⁴⁾, inside-out シグナルの詳細についてはまだ不明な点が多い。活性化に伴いインテグリンの細胞外領域は構造が大きく変化し、インテグリン $\alpha V\beta 3$ 細胞外領域の結晶構造解析より非活性化状態では折れ曲がり構造を取っている細胞外領域が活性化状態では起き上がって直立するとされている(図1B)⁵⁾。また、Nanodisc と呼ばれるリン脂質膜に血小板より精製したインテグリン $\alpha IIb\beta 3$ を埋め込み、その細胞内領域に Talin-head ドメインを結合させ $\alpha IIb\beta 3$ 活性化を誘導した場合にも $\alpha IIb\beta 3$ が起き上がることが電子顕微鏡による観察で明らかにされている⁶⁾。

3. 血小板無力症症例の解析による インテグリン $\alpha IIb\beta 3$ 活性化機構の解析

インテグリンの中で $\alpha IIb\beta 3$ は血小板無力症症例の解析により最も理解が進んでいるインテグリンのひとつである。 $\alpha IIb\beta 3$ は主にフィブリンノーゲン受容体として血栓形成において主要な役割を果たしており、先天的に αIIb もしくは $\beta 3$ のどちらかのサブユニットに変異を有する血小板無力症では止血異常が見られる^{7)・10)}。インテグリンの多くは異なる種類の細胞に幅広く発現する

ためインテグリン発現欠損マウスでは様々な器官形成、機能に影響が及び多くの場合胎生致死となる¹¹⁾。しかし αIIb の発現はほぼ巨核球・血小板に限定されているため αIIb 欠損マウスでは血小板凝集の著明な障害が見られるが他の臓器、機能に異常は認められない¹²⁾。一方 $\beta 3$ は $\alpha IIb\beta 3$ 以外に $\alpha V\beta 3$ として血管内皮細胞、破骨細胞など幅広い発現が見られ、 $\beta 3$ 欠損マウスでは血小板機能異常に加え、破骨細胞の骨吸収異常による大理石病、血管新生の亢進といった表現型が観察される¹³⁾。しかし、 $\beta 3$ に変異を持つヒト血小板無力症患者ではマウスの場合と異なり血小板機能異常以外に明らかな異常は伴わず、止血異常という比較的発見しやすい症状が見られることが $\alpha IIb\beta 3$ の解析が進んできた理由と考えられる。血小板無力症症例の多くは変異により $\alpha IIb\beta 3$ の発現が低下するが、発現は正常レベルの20%以上に保たれるが変異により $\alpha IIb\beta 3$ の機能に異常を持つ variant タイプの解析が $\alpha IIb\beta 3$ の機能解析に大きく貢献している^{8)・9)}。代表的な $\beta 3$ 変異としてリガンド結合部位の解析に貢献した $\beta 3$ 細胞外領域の Asp119Tyr 置換¹⁴⁾、 $\alpha IIb\beta 3$ 活性化における $\beta 3$ 細胞内領域の重要性を示した $\beta 3$ 細胞内領域の Arg724Ter 変異¹⁵⁾、Kindlin-3 結合障害により $\alpha IIb\beta 3$ 活性化が誘導されない $\beta 3$ 細胞内領域での Ser752Pro 変異¹⁶⁾などがあげられ

る. もうひとつ最近報告されている細胞内領域の興味深い変異として α IIb-Arg995 と β 3-Asp723 に生じる変異があり, それぞれ両サブユニット細胞内領域の細胞膜直下に存在し α IIb-Arg995 と β 3-Asp723 の間で作られる salt-bridge は α IIb β 3 活性化制御に重要とされている¹⁷⁾. 実際に α IIb における Arg995Gln¹⁸⁾, Arg995Trp¹⁹⁾, β 3 における Asp723His 変異²⁰⁾ を持つ血小板ではこの salt-bridge が形成されず, アゴニスト刺激なしに恒常的に α IIb β 3 が活性化している. また, これらの変異では α IIb β 3 の活性化に加え血小板産生, macrothrombocytopenia との関連も注目されている^{19) 21)}.

4. α IIb β 3 阻害剤の現状

血小板は止血以外にも脳卒中, 虚血性心疾患など病的血栓形成にも関与しており血栓症コントロールの重要なターゲットとして α IIb β 3 阻害剤が開発され, 現在 abciximab, tirofiban, eptifibatide の3種類の注射剤が欧米において急性冠動脈疾患症例に対する抗血栓薬として使用されている^{22) 23)}. 3剤はいずれも α IIb β 3 の細胞外領域に結合し, フィブリノゲン結合の阻害による血小板凝集抑制効果が期待されていたが日本では有効性を示す結果が得られなかったこともあり使用されておらず²⁴⁾, 近年欧米でも α IIb β 3 阻害剤の使用は減少傾向にあり, 現在使用されている抗血小板薬はアスピリン, ADP 受容体 P2Y₁₂ 阻害剤が中心である. また, 長期的な血小板機能コントロールを目指した経口 α IIb β 3 阻害剤の開発は臨床試験において期待された効果が得られなかったのみならず, α IIb β 3 阻害剤投与による死亡率の増加が見られ開発が中止されている²⁵⁾. これは α IIb β 3 阻害剤の結合が α IIb β 3 活性化を誘導した結果と考えられている.

5. 腫瘍領域におけるインテグリン発現

α IIb β 3 が発現しているインテグリンの大部分を占める血小板と異なり, 固形癌の腫瘍細胞では様々なインテグリンの発現が見られ, 古くから腫瘍細胞の起源となる正常組織とのインテグリン発

現パターンの変化, 悪性度とインテグリン発現との相関などが検討されてきた. 例えばメラノーマに発現する α v β 3 は腫瘍細胞の悪性度と発現の相関がはっきりしている. 正常のメラノサイトでは α v β 3 発現は見られないが, 皮膚に沿って水平方向へ浸潤していく (radial growth phase) 低悪性度のメラノーマ細胞では発現レベルは低いものの α v β 3 発現が見られるようになる. しかし, 皮膚の深部へ向けて浸潤する高悪性度メラノーマ (vertical growth phase) では α v β 3 発現レベルが上昇し, α v β 3 の高発現は予後不良と相関する²⁶⁾. また, α v β 3 のみでなく β 1 発現レベルの上昇もメラノーマにおける予後不良因子である^{27) 28)}. β 1 発現レベルの上昇と予後不良との関連については乳癌^{29) 30)}, 肺癌³¹⁾ など多くの腫瘍で報告されており, β 1 コンディショナルノックアウトマウスを用いた乳癌モデルでも乳癌の発生³²⁾, 転移³³⁾ における β 1 発現の重要性が示されている. しかし, β 1 が α 2 インテグリンとカップリングしコラーゲン受容体 α 2 β 1 として発現している場合, その発現は乳癌, 前立腺癌での良好な予後と相関することが報告されており³⁴⁾, 腫瘍における複雑なインテグリンの役割が予想される.

腫瘍関連では血管内皮細胞に発現する α v β 3 も重要であり, 定常状態にある血管内皮細胞では発現が見られないが増殖している腫瘍内の新生血管では α v β 3 の発現が亢進しており血管内皮細胞の遊走, 増殖に関与している. しかし, α v 欠損マウス³⁵⁾, β 3 欠損マウス¹³⁾ いずれも予想された血管形成異常が見られず, 加えて β 3 欠損マウスでは血管内皮細胞での VEGFR2 の発現亢進によると考えられる腫瘍増殖, 血管新生の亢進³⁶⁾ が見られインテグリンと他の受容体とのクロストークによる複雑な制御が示唆されている.

6. 腫瘍領域における抗インテグリン療法

血小板における α IIb β 3 ほど明白ではないが腫瘍細胞上のインテグリンも治療ターゲットとして重要であることは明らかであり, 臨床応用に向け最も活発に開発されてきたのが Cilengitide³⁷⁾ をはじめとする α v β 3 阻害剤である. α v β 3 はリガンドの Arg-Gly-Asp (RGD) 配列を認識して結

合するが、RGD 配列を含む環状ペプチドである Cilengitide は α_v 特異的な阻害剤として血管新生阻害作用に加え、腫瘍細胞自身に発現する $\alpha_v\beta_3$ への阻害作用も併せて期待されてきた。In vitro では血管内皮細胞、腫瘍細胞と細胞外マトリックスとの結合の抑制による接着、遊走、増殖の抑制作用が認められたが、多くの臨床研究で期待された効果は得られず、現在はグリオブラストーマに対する第3相臨床試験が進行中である³⁸⁾。しかし最近報告された MGMT 遺伝子プロモーターにメチル化を伴うグリオブラストーマ症例に対する第3相試験 CENTRIC study では、放射線治療と Temozolomide の併用療法に Cilengitide を加えても生存期間の延長は得られなかった。またマウスに高濃度の Cilengitide を投与すると血管新生阻害による抗腫瘍効果が見られるものの、低濃度では逆に血管新生の亢進、腫瘍の増大という予想外の結果が報告されている³⁹⁾。このようにリガンド結合阻害作用を期待した $\alpha_v\beta_3$ 阻害剤は厳しい状況であるが、RGD ペプチドに薬剤を conjugate させ腫瘍内の新生血管特異的に薬剤をデリバリーするなど異なる方法も試されている⁴⁰⁾。この方法では $\alpha_v\beta_3$ を発現する腫瘍細胞への効果も併せて期待されるが、実際に投与した RGD ペプチドは血管内皮細胞に分布するのみで腫瘍の深部には到達しない。腫瘍の深部まで薬剤を浸透させるためのユニークな試みとして CRGDK/RGPD 配列を含む iRGD が開発されている⁴¹⁾。iRGD は RGD を介したターゲット細胞への結合の後、プロテアーゼによる切断を受け neuropilin-1 に結合することで血管から腫瘍の深部へと浸透するためより強い効果が期待される。

7. 腫瘍細胞におけるインテグリン活性化の役割

腫瘍細胞に発現するインテグリンが重要であることは明らかであるが、これまで腫瘍細胞上のインテグリン活性化について論じられることはあまりなかった。この理由として、1) 腫瘍細胞では in vitro において血小板のように inside-out シグナル、つまりインテグリン活性化を惹起できないこと、2) 活性化したインテグリンを検出するための良い抗体が存在しないこと、などが

考えられる。血小板をアゴニストで刺激すると $\alpha_{IIb}\beta_3$ は活性化され、活性化 $\alpha_{IIb}\beta_3$ は活性化認識抗体 PAC-1⁴²⁾ や蛍光ラベルしたフィブリノゲンの結合をフローサイトメトリーにより容易に検出することができる。腫瘍細胞、血管内皮細胞に発現する $\alpha_v\beta_3$ にも活性化 $\alpha_v\beta_3$ 認識抗体 WOW-1 が樹立されており⁴³⁾、フローサイトメトリーを用いた活性化 $\alpha_v\beta_3$ の検出が可能である。しかし、腫瘍細胞や血管内皮細胞でのアゴニスト刺激による $\alpha_v\beta_3$ 活性化誘導が困難なことに加え、PAC-1 と比較し非特異結合が多く見られる WOW-1 では細胞上に $\alpha_v\beta_3$ の高い発現レベルが要求され活性化の評価は難しい。また、腫瘍組織切片における活性化 $\alpha_v\beta_3$ の検出に関しては、WOW-1 を用いた場合に安定した染色結果を得ることは技術的に困難な状況である。活性化 β_1 インテグリンの検出にはクローン 9EG7, 15/7, HUTS-4 などの抗体が知られているが PAC-1, WOW-1 がインテグリン上のリガンド結合部位に直接結合するのに対して、活性化 β_1 認識抗体のエピトープはリガンド結合部位そのものではなく活性化に伴うインテグリンの構造変化を認識しているとされ、より特異性の高い活性化 β_1 認識抗体の開発が待たれる。

次に筆者らが最近報告した腫瘍転移における β_1 インテグリン活性化の役割についての成績⁴⁴⁾の一部を以下に紹介する。腫瘍転移のプロセスは原発腫瘍の形成に始まり、腫瘍細胞の血管内への移動、転移組織への定着、新しい環境下での増殖と長く複雑な過程から成り立ち、それぞれのステップで必要なインテグリンの機能は異なると考えられる。筆者らは chick embryo (鶏胚) にヒトメラノーマ MDA-MB435 細胞を静注した後に肝臓へ定着するステップに着目し (図 2A)、肝臓への定着細胞数はヒト特異的 Alu 配列を用いたリアルタイム PCR により定量した⁴⁵⁾。腫瘍細胞上に発現するインテグリンのノックダウンにより、腫瘍細胞の肝臓への定着は β_3 ではなく β_1 の発現に依存しており (図 2B)、中でもコラーゲン受容体である $\alpha_2\beta_1$ が最も重要であった (図 2C)。では肝臓へ定着する過程で腫瘍細胞上の β_1 は活性化する必要があるだろうか？ これに答えるために β_1 ノックダウン

図2 インテグリン発現と腫瘍細胞の肝臓への定着

A) ヒトメラノーマ MDA-MB435 細胞を尿膜静脈 (Chorioallantoic vein) より chick embryo へ静注し, 5 日後に肝臓を回収。ゲノム DNA を精製し, ヒト特異的 Alu 配列を用いたリアルタイム PCR により肝臓へ定着した腫瘍細胞を定量した。

B) MDA-MB435 細胞に発現する β サブユニットをノックダウンすると $\beta 1$ ノックダウンにより有意な肝臓への定着の抑制が見られたが, $\beta 3$ ノックダウンは影響しなかった。

C) MDA-MB435 細胞に発現する α サブユニットをノックダウンすると $\alpha 2$ をノックダウンした場合のみ有意に肝臓への定着が抑制された。この実験系における腫瘍細胞の肝臓への定着は $\beta 1$ インテグリン依存性に起こっており, 中でもコラーゲン受容体 $\alpha 2\beta 1$ が重要と考えられる (文献 44 より引用, 一部改変)。

MDA-MB435 細胞に $\beta 1$ 野生型 (WT), あるいは細胞内領域に Ile782Ala 変異を持つ $\beta 1$ -I782A を発現させた。 $\beta 1$ 細胞内領域への I782A 変異の導入は Talin と $\beta 1$ 細胞内領域の結合を障害し inside-out シグナルによる $\beta 1$ の活性化を障害するが⁴⁶⁾, $\beta 1$ -I782A のリガンド結合能自体は保たれる。これは $\beta 1$ -I782A 細胞の固相化リガンドへの接着は $\beta 1$ WT に比べ著明に低下するが, Mn^{2+} 処理による細胞外からの強制的なインテグリンの活性化により $\beta 1$ -I782A 細胞も $\beta 1$ WT 同等に接着することで分かる (図 3)。これらの細胞を chick embryo へ静注すると $\beta 1$ -I782A 細胞の肝臓への定着は著明に抑制されており (図 4), $\beta 1$ 活性化の役割が示唆されたが I782A 変異の inside-out シグナル以外への作用の結果である可能性も否定できない。そこで inside-out シグナルに関係なく恒常的に $\beta 1$ を活性化させる L358A 変異⁴⁷⁾を導入した $\beta 1$ -L358A/I782A 発現細胞

図3 $\beta 1$ 変異発現 MDA-MB435 細胞の固相化リガンドへの接着

$\beta 1$ インテグリンのリガンドとなるコラーゲンとラミニンを固相化し, MDA-MB435 細胞の接着を定量した。

A) $\beta 1$ WT 発現細胞に比べ, 細胞内領域への Talin の結合が障害される $\beta 1$ -I782A 発現細胞の接着は著明に抑制されている。しかし L358A 恒常的活性化変異を導入した $\beta 1$ -L358A/I782A 細胞では inside-out 非依存性に $\beta 1$ が恒常的に活性化されているため Talin の結合が障害されていても細胞は接着可能である (文献 44 より一部改変)。

B) $\beta 1$ -I782A 細胞は inside-out シグナルの障害により接着が著明に低下しているが, Mn^{2+} による細胞外からの強制的なインテグリン活性化の誘導により接着が可能となる。これは $\beta 1$ -I782A 細胞では $\beta 1$ 活性化は障害されているもののリガンド結合能自体は保たれていることを示している。

を作製した。この細胞では I782A により inside-out シグナルは障害されているが, $\beta 1$ は恒常的に活性化しリガンドと結合可能な状態にあり (図 3A), 肝臓への定着は $\beta 1$ -I782A 細胞に比べ有意な増加が $\beta 1$ -L358A/I782A 細胞で見られた (図 4)。I782A 変異による肝臓への定着抑制効果が L358A による $\beta 1$ 恒常的活性化によって回復したことは, I782A が主に $\beta 1$ 活性化の障害に働いていることを示唆するとともに, やはり $\beta 1$ 活性化が肝臓への定着に重要であることを示している。他にも Talin ノックダウン, inside-out シグナル抑制作用を持つ Rap1-GAP の過剰発現により腫瘍細胞の肝臓への定着は抑制されたが, 同様に L358A 変異, または Talin-head ドメイン導入による恒常的 $\beta 1$ 活性化により肝臓への定着は回復した (図 5)。依然として腫瘍細胞におけるインテグリン活性化の詳細は明らかでないものの,

図4 腫瘍細胞の肝臓への定着におけるβ1インテグリン活性化の重要性

Inside-out シグナルの障害されたβ1-I782Aを発現するMDA-MB435細胞を静注した後の肝臓への定着はβ1WT発現細胞に比べ著明に低下している。しかしβ1細胞外領域へのL358A変異の導入によりβ1をリガンド結合可能な状態にすると肝臓への定着が回復し、腫瘍細胞の肝臓への定着にはTalinにより誘導されるβ1活性化が重要な役割を持つことを示している(文献44より一部改変)。

図5 腫瘍細胞の肝臓への定着におけるTalin, Rap1-GAPにより誘導されるβ1インテグリン活性化の重要性

A) Inside-out シグナルで最も重要なTalinをノックダウンするとMDA-MB435細胞の肝臓への定着は抑制されるが、この抑制はTalin-headドメインの導入によりβ1インテグリンを活性化すると回復が見られる。

B) Rap1-GAPの過剰発現はβ1の活性化を抑制するが、Rap1-GAPを過剰発現させてMDA-MB435細胞では肝臓への定着が抑制されている。しかしL358A変異によりβ1が恒常的に活性化している細胞ではRap1GAPの過剰発現による抑制効果は見られない。

これらの結果はinside-outシグナルによるβ1活性化が肝臓への定着に重要であることを示している(文献44より一部改変)。

筆者らの成績より腫瘍細胞に発現するβ1が血小板上のαIIbβ3と同様のinside-outシグナルによる活性化制御を転移の形成過程で必要としていることが明らかとなった。

では、実際にヒトの腫瘍組織でβ1の活性化は起こっているのだろうか？これまで活性化β1認識抗体はホルマリン固定後パラフィン包埋された検体の染色は困難とされてきたが、条件を最適化することでクローン9EG7による染色が可能である(図6A)。組織マイクロアレイを使用してメラノーマ原発腫瘍と転移性腫瘍におけるβ1活性化認識抗体9EG7のシグナルをβ1発現量で

補正し、β1活性化状態を定量比較すると転移性腫瘍で有意な9EG7シグナルの増加、つまりβ1活性化の亢進が見られた(図6B)。このシグナルの違いの意義についてはさらなる検討が必要ではあるが、少なくとも活性化状態のβ1が実際の組織に存在しており、動物モデルの結果と合わせて腫瘍転移におけるβ1活性化の役割を示唆していると考えられる。

8. インテグリンをターゲットとした治療の課題

実際に臨床応用されている受容体阻害剤は数多

図6 腫瘍組織におけるβ1インテグリンの活性化

A) Chicken egg の Chorioallantoic membrane (CAM) 上で MDA-MB435 細胞を 1 週間培養し、形成された腫瘍をホルマリン固定後パラフィンに包埋した後に切片を作製。β1 発現の検出には抗 β1 抗体クローン 4B7R、活性化 β1 の検出にはクローン 9EG7 を使用した。中央の β1 ノックダウン細胞から形成された腫瘍では β1 の発現、活性化ともに認めないが、β1WT 発現細胞からの腫瘍では β1 の発現と軽度の活性化 β1 からのシグナルが見られる。恒常的に β1 の活性化している β1-L358A 細胞からの腫瘍では 9EG7 染色によるはっきりとしたシグナルが検出される。

B) 50 例のメラノーマ原発腫瘍、26 例のメラノーマ転移性腫瘍における 9EG7 によるシグナルを β1 の発現量で補正することで β1 活性化を定量すると、原発腫瘍に比べ転移性腫瘍での β1 活性化は有意な亢進が見られた (文献 44 より一部改変)。

くある中、なぜインテグリン阻害剤は期待された効果を得られないのであろうか。インテグリンはリガンドと結合するためには inside-out シグナルによる構造変化を伴う活性化を行う必要がある複雑な受容体である。おそらく *in vivo* の条件下では細胞周囲に豊富に存在するリガンドと阻害剤の競合、インテグリン阻害剤がリガンド結合を阻害する以外に何らかのアーチファクトを伴う可能性などが原因と考えられる。Inside-out シグナル研究に関しては血小板が最も進んでいるが、無核の血小板では直接の遺伝子導入操作ができないため血小板を用いた活性化機構の解明は困難である。今後は ES 細胞⁴⁸⁾、iPS 細胞由来の培養巨核球および血小板⁴⁹⁾、inside-out シグナルの観察が可能である巨核球系 CMK 細胞株⁵⁰⁾ などを用いたインテグリン活性化機構のさらなる解明が期待される。また、腫瘍細胞でも血小板同様にインテグリンは inside-out シグナルによる活性化制御を受けていると考えられ、従来のリガンド結合の阻害を直接のターゲットとしてきた抗インテグリン療法とは異なり、今後はインテグリン活性化制御、inside-out シグナルをターゲットとした新たな抗インテ

グリン療法による癌治療の開発が期待される。

謝 辞

本総説中で示した研究結果はカリフォルニア大学サンディエゴ校血液・腫瘍科において Sanford J. Shattil 教授の御指導のもと進められたものであり、この場をお借りして厚く御礼を申し上げます。

Disclosure of Conflict of Interests

The authors indicated no potential conflict of interest.

文 献

- 1) Shattil SJ, Kim C, Ginsberg MH : The final steps of integrin activation : the end game. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11** : 288-300, 2010.
- 2) Tadokoro S, Shattil SJ, Eto K, Tai V, Liddington RC, de Pereda JM, Ginsberg MH, Calderwood DA : Talin binding to integrin beta tails : a final common step in integrin activation. *Science* **302** : 103-106, 2003.
- 3) Anthis NJ, Campbell ID : The tail of integrin activation. *Trends Biochem Sci* **36** : 191-198, 2011.
- 4) Meves A, Stremmel C, Gottschalk K, Fassler R : The Kindlin protein family : new members to the club of focal adhesion proteins. *Trends Cell Biol* **19** : 504-513, 2009.
- 5) Xiong JP, Stehle T, Diefenbach B, Zhang R, Dunker R, Scott

- DL, Joachimiak A, Goodman SL, Arnaout MA : Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. *Science* **294** : 339-345, 2001.
- 6) Ye F, Hu G, Taylor D, Ratnikov B, Bobkov AA, McLean MA, Sligar SG, Taylor KA, Ginsberg MH : Recreation of the terminal events in physiological integrin activation. *J Cell Biol* **188** : 157-173, 2010.
 - 7) 富山佳昭 : 血小板無力症. *日本血栓止血学会誌* **16** : 171-178, 2005.
 - 8) Nurden AT, Fiore M, Nurden P, Pillois X : Glanzmann thrombasthenia : a review of ITGA2B and ITGB3 defects with emphasis on variants, phenotypic variability, and mouse models. *Blood* **118** : 5996-6005, 2011.
 - 9) Nurden AT, Pillois X, Nurden P : Understanding the genetic basis of Glanzmann thrombasthenia : implications for treatment. *Expert Review of Hematology* **5** : 487-503, 2012.
 - 10) Tomiyama Y : Glanzmann thrombasthenia : integrin alpha IIb beta 3 deficiency. *Int J Hematol* **72** : 448-454, 2000.
 - 11) Bouvard D, Brakebusch C, Gustafsson E, Aszodi A, Bengtsson T, Berna A, Fassler R : Functional consequences of integrin gene mutations in mice. *Circ Res* **89** : 211-223, 2001.
 - 12) Tronik-Le Roux D, Roullot V, Poujol C, Kortulewski T, Nurden P, Marguerie G : Thrombasthenic mice generated by replacement of the integrin alpha (IIb) gene : demonstration that transcriptional activation of this megakaryocytic locus precedes lineage commitment. *Blood* **96** : 1399-1408, 2000.
 - 13) Hodivala-Dilke KM, McHugh KP, Tsakiris DA, Rayburn H, Crowley D, Ullman-Cullere M, Ross FP, Collier BS, Teitelbaum S, Hynes RO : Beta3-integrin-deficient mice are a model for Glanzmann thrombasthenia showing placental defects and reduced survival. *J Clin Invest* **103** : 229-238, 1999.
 - 14) Loftus JC, O'Toole TE, Plow EF, Glass A, Frelinger AL, 3rd, Ginsberg MH : A beta 3 integrin mutation abolishes ligand binding and alters divalent cation-dependent conformation. *Science* **249** : 915-918, 1990.
 - 15) Wang R, Shattil SJ, Ambruso DR, Newman PJ : Truncation of the cytoplasmic domain of beta3 in a variant form of Glanzmann thrombasthenia abrogates signaling through the integrin alpha (IIb) beta3 complex. *J Clin Invest* **100** : 2393-2403, 1997.
 - 16) Chen YP, Djaffar I, Pidar D, Steiner B, Cieutat AM, Caen JP, Rosa JP : Ser-752->Pro mutation in the cytoplasmic domain of integrin beta 3 subunit and defective activation of platelet integrin alpha IIb beta 3 (glycoprotein IIb-IIIa) in a variant of Glanzmann thrombasthenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89** : 10169-10173, 1992.
 - 17) Hughes PE, Diaz-Gonzalez F, Leong L, Wu C, McDonald JA, Shattil SJ, Ginsberg MH : Breaking the integrin hinge. A defined structural constraint regulates integrin signaling. *J Biol Chem* **271** : 6571-6574, 1996.
 - 18) Peyruchaud O, Nurden AT, Milet S, Macchi L, Pannochia A, Bray PF, Kieffer N, Bourre F : R to Q amino acid substitution in the GFFKR sequence of the cytoplasmic domain of the integrin IIb subunit in a patient with a Glanzmann's thrombasthenia-like syndrome. *Blood* **92** : 4178-4187, 1998.
 - 19) Kunishima S, Kashiwagi H, Otsu M, Takayama N, Eto K, Onodera M, Miyajima Y, Takamatsu Y, Suzumiya J, Matsubara K, Tomiyama Y, Saito H : Heterozygous ITGA2B R995W mutation inducing constitutive activation of the alphaIIb beta3 receptor affects proplatelet formation and causes congenital macrothrombocytopenia. *Blood* **117** : 5479-5484, 2011.
 - 20) Ghevaert C, Salsmann A, Watkins NA, Schaffner-Reckinger E, Rankin A, Garner SF, Stephens J, Smith GA, Debili N, Vainchenker W, de Groot PG, Huntington JA, Laffan M, Kieffer N, Ouwehand WH : A nonsynonymous SNP in the ITGB3 gene disrupts the conserved membrane-proximal cytoplasmic salt bridge in the alphaIIb beta3 integrin and cosegregates dominantly with abnormal proplatelet formation and macrothrombocytopenia. *Blood* **111** : 3407-3414, 2008.
 - 21) Kashiwagi H, Kunishima S, Kiyomizu K, Amano Y., Shimada H, Morishima M, Kanakura Y, Tomiyama Y : Demonstration of novel gain-of-function mutations of alphaIIb beta3 : association with macrothrombocytopenia and glanzmann thrombasthenia-like phenotype. *Molecular Genetics and Genomic Medicine* **1** : 77-86, 2013.
 - 22) Bledzka K, Smyth SS, Plow EF : Integrin alphaIIb beta3 : from discovery to efficacious therapeutic target. *Circ Res* **112** : 1189-1200, 2013.
 - 23) Armstrong PC, Peter K : GPIIb/IIIa inhibitors : From bench to bedside and back to bench again. *Thromb Haemost* **107** : 808-814, 2012.
 - 24) Nakagawa Y, Nobuyoshi M, Yamaguchi T, Meguro T, Yokoi H, Kimura T, Hosoda S, Kanmatsuse K, Matsumori A, Sasayama S : Efficacy of abciximab for patients undergoing balloon angioplasty : data from Japanese evaluation of c7E3 Fab for elective and primary PCI organization in randomized trial (JEPPORT). *Circ J* **73** : 145-151, 2009.
 - 25) Chew DP, Bhatt DL, Sapp S, Topol EJ : Increased mortality with oral platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonists : a meta-analysis of phase III multicenter randomized trials. *Circulation* **103** : 201-206, 2001.
 - 26) Hieken TJ, Farolan M, Ronan SG, Shilkaitis A, Wild L, Das Gupta TK : Beta3 integrin expression in melanoma predicts subsequent metastasis. *J Surg Res* **63** : 169-173, 1996.
 - 27) Hieken TJ, Ronan SG, Farolan M, Shilkaitis AL, Kim DK, Das Gupta TK : Beta 1 integrin expression in malignant melanoma predicts occult lymph node metastases. *Surgery* **118** : 669-673 ; discussion 673-665, 1995.
 - 28) Nikkola J, Vihinen P, Vlaykova T, Hakka-Kemppinen M, Heino J, Pyrhonen S : Integrin chains beta1 and alpha v as prognostic factors in human metastatic melanoma. *Melanoma Res* **14** : 29-37, 2004.
 - 29) dos Santos PB, Zanetti JS, Ribeiro-Silva A, Beltrao EI : Beta 1 integrin predicts survival in breast cancer : a clinicopathological and immunohistochemical study. *Diagn Pathol* **7** : 104, 2012.
 - 30) Yao ES, Zhang H, Chen YY, Lee B, Chew K, Moore D, Park C : Increased beta1 integrin is associated with decreased survival in invasive breast cancer. *Cancer Res* **67** : 659-664, 2007.
 - 31) Dingemans AM, van den Boogaart V, Vosse BA, van Suylen RJ, Griffioen AW, Thijssen VL : Integrin expression profiling identifies integrin alpha5 and beta1 as prognostic factors in early stage non-small cell lung cancer. *Mol Cancer* **9** : 152, 2010.
 - 32) White DE, Kurpios NA, Zuo D, Hassell JA, Blaess S, Mueller U, Muller WJ : Targeted disruption of beta1-integrin in a transgenic mouse model of human breast cancer reveals an essential role in mammary tumor induction. *Cancer Cell* **6** : 159-170, 2004.
 - 33) Huck L, Pontier SM, Zuo DM, Muller WJ : beta1-integrin is dispensable for the induction of ErbB2 mammary tumors but plays a critical role in the metastatic phase of tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107** : 15559-15564, 2010.
 - 34) Ramirez NE, Zhang Z, Madamanchi A, Boyd KL, O'Rear LD, Nashabi A, Li Z, Dupont WD, Zijlstra A, Zutter MM : The alpha(2)beta(1) integrin is a metastasis suppressor in mouse models and human cancer. *J Clin Invest* **121** : 226-237, 2011.
 - 35) Bader BL, Rayburn H, Crowley D, Hynes RO : Extensive vasculogenesis, angiogenesis, and organogenesis precede lethality in mice lacking all alpha v integrins. *Cell* **95** : 507-519, 1998.
 - 36) Taverna D, Moher H, Crowley D, Borsig L, Varki A, Hynes RO : Increased primary tumor growth in mice null for beta3- or beta3/beta5-integrins or selectins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101** : 763-768, 2004.
 - 37) Mas-Moruno C, Rechenmacher F, Kessler H : Cilengitide : the first anti-angiogenic small molecule drug candidate design, synthesis and clinical evaluation. *Anticancer Agents Med Chem* **10** : 753-768, 2010.
 - 38) Kurozumi K, Ichikawa T, Onishi M, Fujii K, Date I : Cilengitide treatment for malignant glioma : current status and future direction. *Neurol Med Chir (Tokyo)* **52** : 539-547, 2012.
 - 39) Reynolds AR, Hart IR, Watson AR, Welti JC, Silva RG,

- Robinson SD, Da Violante G, Gourlaouen M, Salih M, Jones MC, Jones DT, Saunders G, Kostourou V, Perron-Sierra F, Norman JC, Tucker GC, Hodiola-Dilke KM : Stimulation of tumor growth and angiogenesis by low concentrations of RGD-mimetic integrin inhibitors. *Nat Med* **15** : 392-400, 2009.
- 40) Danhier F, Le Breton A, Preat V : RGD-based strategies to target alpha(v) beta(3) integrin in cancer therapy and diagnosis. *Mol Pharm* **9** : 2961-2973, 2012.
- 41) Sugahara KN, Teesalu T, Karmali PP, Kotamraju VR, Agemy L, Girard OM, Hanahan D, Mattrey RF, Ruoslahti E : Tissue-penetrating delivery of compounds and nanoparticles into tumors. *Cancer Cell* **16** : 510-520, 2009.
- 42) Shattil SJ, Hoxie JA, Cunningham M, Brass LF : Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex during platelet activation. *J Biol Chem* **260** : 11107-11114, 1985.
- 43) Pampori N, Hato T, Stupack DG, Aidoudi S, Cheresh DA, Nemerow GR, Shattil SJ : Mechanisms and consequences of affinity modulation of integrin alpha(V)beta(3) detected with a novel patch-engineered monovalent ligand. *J Biol Chem* **274** : 21609-21616, 1999.
- 44) Kato H, Liao Z, Mitsios JV, Wang HY, Deryugina EI, Varner JA, Quigley JP, Shattil SJ : The primacy of beta1 integrin activation in the metastatic cascade. *PLoS One* **7** : e46576, 2012.
- 45) Zijlstra A, Mellor R, Panzarella G, Aimes RT, Hooper JD, Marchenko ND, Quigley JP : A quantitative analysis of rate-limiting steps in the metastatic cascade using human-specific real-time polymerase chain reaction. *Cancer Res* **62** : 7083-7092, 2002.
- 46) Bouaouina M, Lad Y, Calderwood DA : The N-terminal domains of talin cooperate with the phosphotyrosine binding-like domain to activate beta1 and beta3 integrins. *J Biol Chem* **283** : 6118-6125, 2008.
- 47) Mould AP, Barton SJ, Askari JA, McEwan PA, Buckley PA, Craig SE, Humphries MJ : Conformational changes in the integrin beta A domain provide a mechanism for signal transduction via hybrid domain movement. *J Biol Chem* **278** : 17028-17035, 2003.
- 48) Eto K, Murphy R, Kerrigan SW, Berton A, Stuhlmann H, Nakano T, Leavitt AD, Shattil SJ : Megakaryocytes derived from embryonic stem cells implicate CalDAG-GEFI in integrin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** : 12819-12824, 2002.
- 49) Takayama N, Nishimura S, Nakamura S, Shimizu T, Ohnishi R, Endo H, Yamaguchi T, Otsu M, Nishimura K, Nakanishi M, Sawaguchi A, Nagai R, Takahashi K, Yamanaka S, Nakauchi H, Eto K : Transient activation of c-MYC expression is critical for efficient platelet generation from human induced pluripotent stem cells. *J Exp Med* **207** : 2817-2830, 2010.
- 50) 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 alpha(IIb)beta(3) activation in a human megakaryoblastic cell line, CMK. *Exp Hematol* **41** : 79-90 e71, 2013.