■ 綜 説 ■

RGD 依存性細胞接着分子ファミリーと血小板機能

関 口 清 俊* 前 田 利 長* 下 村 壮 司*,**
市 原 啓 子* 千 谷 晃 一*

Role of RGD-dependent cell adhesive proteins in platelet adhesion and aggregation

Kiyotoshi SEKIGUCHI*, Toshinaga MAEDA*, Takeshi SHIMOMURA*,**,
Keiko ICHIHARA-TANAKA* and Koichi TITANI*

Key words : fibronectin, von Willebrand factor,
thrombospondin, integrin

緒 言

Arg-Gly-Asp(RGD) トリペプチドを活性中心にもつ一群の細胞接着分子が、血漿や細胞外基質 (Extracellular Matrix; ECM) に豊富に存在することが明らかにされてきた¹⁾。フィブロネクチン (FN) に代表されるこれら細胞接着分子は、多くの場合、(1)コラーゲン、グリコサミノグリカン、フィブリンといった細胞外基質の構成成分に親和性を示す、(2)特徴的な多機能複合ドメイン構造を持つ、(3)細胞の接着や凝集に好都合な多量体分子を形成する、などいくつかの共通した性質を示す^{2~4)}。

一方、細胞表面には、これらの細胞接着分子の RGD (あるいはそれと類似した配列) シグナルを認識するリセプター分子が存在するが、こちらよりガンドの多様性に対応して、一群のリセプターファミリーを形成していることが明らかにされている。“インテグリン (integrin)” と総称されるこれらのリセプター分子は、 α 鎖、 β 鎖、 と呼ばれる分子量 10~20 万の 2 本のサブユニットのヘテロダイマーとして存在し、RGD シグナルとの結合には 2 価金属イオンを要求する^{5,6)}。

RGD シグナルとインテグリンを介する細胞接着システムは、多細胞生物の形態形成と構築を可能にする最も基本的な細胞認識システムの 1 つであるが、臨床的にも創傷治癒、止血血栓、炎症、あるいは癌転移などの場において重要な役割を演じているものと考えられている。特に血栓形成の初期段階においてみられる血小板の血管内皮下組織への粘着とそれに続く凝集では、“Big Four” と呼ばれる 4 種の細胞接着分子 [von Willebrand 因子 (vWF), フィブリンノーゲン (Fbg), FN, トロンボスポンディン (TSP)] が関与するが、これらはいずれも RGD 配列を含む巨大糖タンパク質である⁷⁾ (表 1)。血小板の α 顆粒には、これら 4 種の細胞接着分子が貯蔵されており、血小板が刺激を受けると細胞外に放出される。また、これらの細胞接着分子と結合する血小板表面タンパクが幾つも同定されているが、これらの多くは、インテグリンファミリーの一員であることが判明している^{8~10)}。

本稿では、最近急速に進展しつつあるこれら RGD 依存性細胞接着分子とそのリセプターの構造と機能を、血小板凝集に関与する “Big Four” を中心に整理し、RGD シグナルとインテグリンファミリーによる細胞接着認識システ

* 藤田学園保健衛生大学医学部総合医科学研究科医高分子学教室〔〒470-11 愛知県豊明市香掛町田楽ヶ窪 1-98〕, Institute for Comprehensive Medical Science, Fujita-Gakuen Health University, Aichi, Japan.

** 広島大学原爆放射能医学研究所内科, Research Institute for Nuclear Medicine and Biology, Hiroshima University, Hiroshima, Japan.

表 1 血小板機能に關与する細胞接着分子: "Big Four"

	サブユニット の分子量	1分子を構成する サブユニット数	血漿(血清) 中の濃度	主要産生細胞	結合物質 ^{a)}	RGD 配列
フィブロンекチン (FN)	約 250 kDa	血漿型: 2 細胞型: 2 x n	300 ug/ml (200)	線維芽細胞 血管内皮細胞 肝実質細胞, 他多数	Fbg, TSP COL, HP	RGDS
フィブリノーゲン (Fbg)	A α 64 kDa B β 56 kDa γ 47 kDa	A α x2 B β x2 γ x2	2.5 mg/ml (0)	肝細胞	FN, vWF TSP	RGDF(A α) RGDS(A α) KQAGDV(γ)
von Willebrand 因子 (vWF)	270 kDa	2 x n	10 ug/ml (10)	血管内皮細胞 骨髓巨核球	Fbg, COL, HP	RGDS
トロンボスポンディン (TSP)	140 kDa	3	0.1 ug/ml (20)	血管内皮細胞 線維芽細胞 平滑筋細胞, 他	FN, Fbg, COL, HP	RGDA

^{a)} COL, コラーゲン; HP, ヘパリン.

ムの基本原理とその特異性について概説したい。

I. RGD 依存性細胞接着分子の プロトタイプとしての FN

FN は、コラーゲンやプロテオグリカンとともに細胞の外周に形成される ECM の主要成分の1つであり、ECM への細胞の接着を媒介する主要な細胞接着分子である^{2~4)}。また、FN は血漿中にも可溶性成分として含まれており、組織の損傷時には一過的に損傷部に集積され、周辺の線維芽細胞、上皮細胞、マクロファージの損傷部への動員を促すものと考えられている^{11,12)}。

a) モジューラー構造と機能的ドメイン構造

FN は、基本的には分子量 25万のサブユニット鎖がC末端部で SS 結合により架橋された2量体として合成され、ECM に不溶化されたものは、それがさらに SS 結合で架橋された多量体となる。血漿中の FN (血漿 FN) を構成する2本のサブユニット鎖は、分子量がわずかに異なっているが、これは mRNA 前駆体の可変的スプライシングに起因することが既に明らかにされている^{13~17)}。実際、mRNA 前駆体には、可変的スプライシングを受ける領域が3箇所あり、最大 20 種の分子異性体 (isoform) を生じる。

FN の構造は、既にタンパクレベルでの一次構造の解析と cDNA レベルでの塩基配列の解析から明らかにされている。図 1 に模式的に示したように、FN は I 型、II 型、III 型と呼ばれる3つのモジュールの重複により出来上がっており、これらのモジュールが集合していくつかの機能ドメインを形成している^{2~4)}。例えば、I 型モジュールが5個あるいは3個集合してN末端部とC末端部のフィブリン結合ドメインが作られ、2つのII型モジュールは、コラーゲン結合ドメインの中核を形成している。分子中央部の細胞結合ドメインおよびそのC末端側に存在するヘパリン結合ドメインは、III型モジュールの重複により出来上がっている。このような多機能複合ドメイン構造は、多くの RGD 依存性細胞接着分子についてもみられる特徴の1つである。

b) 細胞接着活性の最小単位、RGDS 配列

1984 年、Pierschbacher と Ruoslahti は、プロテアーゼ消化と合成ペプチドを巧みに利用し、細胞接着活性の最小機能ユニットが Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) というたった4アミノ酸残基であることを発見し、多くの研究者を驚かせた¹⁸⁾ (図 2 参照)。彼らは、FN の細胞接着活性を阻害する単クローン抗体を利用して、FN のペプシン消化物の中から、細胞接着活性を有する 108 アミノ酸残基からなるペプチドを

図 1 FN の構造 ; FN は 3 つのモジュール (I 型, II 型, III 型) の反復によって構成されている。ED-A, ED-B, IIICS は, 可変的スプライシングにより調節を受ける領域である。

単離した。次にこの活性ペプチドをアミノ酸約 30 残基からなる 4 つの合成ペプチドに分割し, この中から細胞接着活性を有する C 末端側の 34 アミノ酸残基 (オリゴペプチド IV) を同定した。同様にして, この 34 アミノ酸残基をさらに小さな合成ペプチドに分割し, 最終的に最小活性単位 Arg-Gly-Asp-Ser 配列に到達した。この 4 アミノ酸残基の中で Arg, Gly, Asp の 3 残基は, どれか 1 つでも他のアミノ酸に置換すると活性が失われるが, 4 番目の Ser だけは, Val, Ala, Thr, Cys, Phe など置換しても活性は保持される。RGDS ペプチドが FN の細胞接着活性の活性中心となっていることは, (1) 合成 RGDS ペプチドをプラスチックやアガロース粒子の表面に結合すると細胞の接着と伸展が起こる, (2) FN をコーティングしたプラスチック表面への細胞の接着は, RGDS ペプチドを反応液中に添加することにより完全に阻害される, という 2 つの実験事実によって証明された。

c) FN の細胞接着シグナルの 2 領域構造仮説

RGDS 配列が FN の細胞接着活性の最小単位であることは, 既に確立した事実であるが, 一方で RGDS 配列やそれを含む小ペプチドでは, もとの FN に比べ非常に弱い活性しか示さないことが報告されている。RGDS 配列を含む種々の細胞接着性リガンドの細胞表面の FN リセプターへの親和性を測定した Akiyama と Yama-

図 2 細胞接着活性を有する最小ペプチドの同定 (文献²⁾ より引用)。

da らの実験によれば, 11 kDa ペプシンフラグメントや合成 RGDS ペプチドのリセプターへの親和性は FN や 75 kDa の細胞結合ドメインに比べて 1/100 程度である¹⁹⁾。この原因としては次の 2 つの可能性が考えられる。第 1 に, 11 kDa フラグメントやオリゴペプチドの中では RGDS 配列が無傷 FN 分子の中と同じコンホメーションをとることができず, そのためにリセプター分子との親和性が低下している可能性。

図3 インテグリンの構造 (文献⁶⁾より引用)。

第2は、RGDS配列が無傷のFN分子と同じ高い活性を発揮するためには、これと協奏的に働く第2のシグナルが必要である可能性である。Yamadaらは、site-directed mutagenesisの手法を利用し、RGDS配列の活性を増強する第2の細胞接着シグナル (synergistic adhesion site; “SAS”) がRGDS配列の130~240アミノ酸残基上流にあることを報告している (図1参照)²⁰⁾。

一方 Maeda らは、DNA組換え技術を利用してRGDS配列をブドウ状球菌の産生する免疫グロブリン結合タンパク、Protein Aに挿入したところ、無傷FNの約50%に相当する高い細胞接着活性が発現することを見出した²¹⁾。このようにして作成した人工細胞接着タンパク質の活性は、反応液中に合成RGDSペプチドを添加することにより完全に阻害され、また、RGDSの代わりに不活性型のRGESペプチドをProtein Aに挿入したのでは活性の発現は認められなかった。興味深いことに、RGDS配列を挿入したProtein AにYamadaらの推定したSAS配列をさらに挿入しても有意な活性の増強は認められなかった²²⁾。SAS配列の実体を含めて、FNの細胞接着シグナルの2領域構造仮説は、今後の検討が必要であろう。

d) RGDS非依存性細胞接着シグナル

FNには、RGDS配列以外に、もう一種類の細胞接着シグナルが存在することが報告されている。このRGDS非依存性シグナルは、IIICS領域と呼ばれる可変ペプチド領域のN末端側

(“CS1”領域)にあり (図1参照)、マクロファージやリンパ系細胞に特異的に接着活性を示らしい²⁶⁾。このシグナルの活性は合成ペプチドでも再現することができ、最小単位はGlu-Ile-Leu-Asp-Val-Pro-Ser-Thrであると最近報告されている²⁴⁾。この他 IIICS領域のC末端側 (“CS5”領域)にはマウスメラノーマ細胞に対し接着活性を示すArg-Glu-Asp-Valというシグナルが存在することが指摘されている²⁵⁾。

e) FNリセプター

ここで簡単にFNを認識する細胞表面リセプター (FN-R) について説明しておきたい。FN-Rの実体は、長い間議論的であり、これまでにヘパラン硫酸、ガングリオシド、47 kDaあるいは140 kDaのタンパク質が候補としてあげられてきた。このFN-Rの問題に決着をつけたのは、やはりRuoslahtiらのグループであった。彼らはFNの細胞結合ドメインを高密度で結合させたアフィニティーカラムを用いてFN-Rを吸着させておき、FN-Rだけを合成RGDSペプチドで特異的に溶出させることに成功し、FN-Rが分子量約14万の2種類のサブユニット (α鎖、β鎖) からできていることを明らかにした (図3参照)²⁶⁾。この2本のサブユニット鎖のアミノ酸配列を調べたところ、これと高いホモロジーを示す細胞表面リセプターが多数存在することが明らかとなった。すなわち、リンパ球を活性化した時、1~2週間してから発現されてくる一群のVLA (very late appearing) 抗原²⁷⁾、白血球の接着に関与するLFA-1, Mac-

表 2 インテグリンスーパーファミリー

	α 鎖 ()内は分子量	β 鎖 ()内は分子量	同一タンパク質		リガンド ^{b)}
			ECM リセプター ^{a)}	血小板膜糖 タンパク質	
VLA ファミリー					
VLA 1	α^1 (210 kDa)	β_1 (130 kDa)			LN(?)
VLA 2	α^2 (160 kDa)	β_1 (130 kDa)	ECMR II	GPIa/IIa	COL
VLA 3	α^3 (135 kDa)	β_1 (130 kDa)	ECMR I		FN, LN, COL
VLA 4	α^4 (150 kDa)	β_1 (130 kDa)	ECMR V		FN
VLA 5	α^5 (130 kDa)	β_1 (130 kDa)	ECMR VI		FN
VLA 6	α^6 (125 kDa)	β_1 (130 kDa)		GPIc/IIa	LN
白血球接着 リセプター ファミリー					
LFA-1	α^L (180 kDa)	β_2 (95 kDa)			ICAM-1
Mac-1	α^M (170 kDa)	β_2 (95 kDa)			C3bi, Fbg, 第 X 因子
p150, 95	α^X (150 kDa)	β_2 (95 kDa)			C3bi
サイトアドヘン ファミリー					
VN-R	α^U (160 kDa)	β_3 (100 kDa)		GPIIb/IIIa	VN, BSP
GPIIb/IIIa	α^{IIb} (142 kDa)	β_3 (100 kDa)			Fbg, FN, vWF, VN

^{a)} 文献 70, 71.

^{b)} LN, ラミニン ; COL, コラーゲン ; ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1 ; BSP, bone sialo-glycoprotein ; VN, ビトロネクチン.

1, p150, 95²⁸⁾, そして血小板の GPIIb/IIIa⁸⁾ やビトロネクチンリセプター (VN-R)²⁹⁾ などである(表 2). これらの関連細胞接着リセプターを総称して“インテグリンスーパーファミリー”と呼ぶ.

インテグリンスーパーファミリーは、それぞれ固有の α 鎖をもっているが、 β 鎖の方は、関連したリセプター群の中では共通している (表 2). たとえば FN-R を含む VLA ファミリーは β_1 鎖を共有しており、白血球接着リセプター群は β_2 鎖を、サイトアドヘンと呼ばれる GPIIb/IIIa と VN-R は β_3 鎖を共有している. β 鎖にはこの他 β_4 と呼ばれる新種も最近見つかっており³⁰⁾, 種類はまだ増える可能性がある.

f) インテグリンによる RGD シグナル認識の特異性

RGD を活性中心にもつ一群の細胞接着分子ファミリーが存在する一方でその RGD シグナルを識別する多数のリセプター分子 (すなわち

インテグリン) が存在するとなると、当然、リセプター分子のリガンド結合特異性が問題となってくる. Pytela らは FN (の細胞結合ドメイン) を不溶化したカラムには、FN-R が特異的に結合し、一方、VN を不溶化したカラムには、FN-R ではなく VN-R が特異的に結合することを示した³¹⁾. 面白いことには、どちらの場合も、カラムに結合したリセプター分子は RGDS ペプチドで溶出される. 同じ RGD シグナルを認識しながら、各リセプター分子が特定のリガンドだけを認識できるのは、リガンドの種類によって RGD シグナルを含む周辺領域のコンホメーションが微妙に異なっているためであろうと推定されている. たとえば同じ RGDS を含む合成ペプチドでも、その N 末端と C 末端をつないで環状にすると、FN-R に対する親和性が激減し、一方 VN-R に対する親和性は増加する³²⁾. またリセプター分子の中には、FN-R のようにリガンド特異性の高いものがある一方で、血小板の GPIIb/IIIa のように FN,

vWF, Fbg, VN, などなんでも結合してしまう結合特異性の広いものもあることがわかっている。

II. FN と血小板機能

a) 血小板の粘着、凝集と FN

FN は、コラーゲンに対する親和性を有することから、血小板の血管内皮下組織（特にコラーゲン線維）に対する粘着に関与する可能性が指摘されている。実際、FN はコラーゲンをコーティングした基質への血小板の粘着を促進する働きがあり、特に low shear rate の灌流条件下ではその効果が顕著にあらわれることが見いだされている³³⁾。（なお、high shear rate の場合には、後述の vWF の役割が重要視されている）。一方、粘着に続く血小板の凝集反応における FN の積極的な関与を示唆する証拠は得られていない。実際 ADP やトロンビン刺激による血小板の凝集は FN を除いた血漿中でも正常に起こることが示されている³⁴⁾。かつて血小板のコラーゲン凝集に異常を示す Ehlers-Danlos 症候群の患者において、これが FN の異常によるとの報告があったが³⁵⁾、この結果は、FN を除去した血漿中でも血小板凝集が正常に起こるとの上述の結果と矛盾しており、信憑性が疑われている。

b) 血小板表面の FN リセプター

血小板の α 顆粒の中には、他の “Big Four” のメンバーとともに FN が貯蔵されており、ADP やトロンビンにより血小板が活性化されると exocytosis により細胞外に放出される。また血小板の活性化に伴って、血小板表面に FN が出現することが知られている。静止状態の血小板表面には FN は検出されない。活性化血小板への FN の結合を測定した Plow と Ginsburg らの結果によれば、飽和時で血小板当たり 120,000 分子の FN が結合でき、Km は 300 nM であった⁷⁾。FN の血小板への結合は EDTA で阻害されることから 2 価金属イオンを要求するものと考えられる。

血小板表面の FN 結合部位は、次のような理由から GPIIb/IIIa であろうと考えられる。第 1 に、GPIIb/IIIa を先天的に欠損している Gla-

nzmann 型血小板無力症の患者の血小板では、FN の結合がみられない³⁶⁾。第 2 に GPIIb/IIIa に対する抗体は血小板への FN の結合を阻害する³⁷⁾。第 3 に、FN の細胞結合ドメインを不溶化したアフィニティーカラムを用いると、血小板膜蛋白の中で GPIIb/IIIa が選択的に吸着される³¹⁾。第 4 に、精製した GPIIb/IIIa を取り込ませたりポソームは、FN をコーティングした基質に結合し、この結合は合成 RGDS ペプチドによって阻害される³¹⁾。

GPIIb/IIIa は前述のように、インテグリンスーパーファミリーの 1 つのメンバーであり、GPIIb は α^{IIb} 、GPIIIa は β_3 と呼ぶことに統一されつつある。血小板表面にはこれ以外のインテグリンスーパーファミリーのメンバーも共存しており、GPIa/IIa、GPIC/IIa はそれぞれ VLA2 と VLA6 と同一分子であることが最近明らかにされている^{9,10)}。

VLA2 と VLA6 はそれぞれコラーゲンとラミニンに特異的に結合する。実際、コラーゲン凝集能を欠損した患者の血小板は、GPIa を欠いていることが報告されている³⁸⁾。

III. フィブリノーゲン (Fbg)

a) 血小板表面の Fbg リセプター

血小板の凝集には、2 価金属イオンの他に血漿由来のタンパク成分、特に Fbg が必要であることが 1978 年、洗浄血小板を用いた Mustard らの実験により明らかにされた³⁹⁾。その後、放射標識 Fbg の洗浄血小板への結合が詳しく調べられ、静止状態の血小板には Fbg はほとんど結合せず、活性化に伴ってはじめて Fbg 結合部位が血小板表面に発現してくることが明らかにされた。この Fbg リセプターが FN リセプターの場合と同様に GPIIb/IIIa であることは、a) 血小板無力症の患者の血小板には Fbg リセプターがほとんど発現していない⁴⁰⁾、b) 抗 GPIIb/IIIa 抗体により Fbg の結合が阻害される⁴¹⁾、そして c) フォトアフィニティーラベル法を用いて、血小板表面に結合した Fbg の最近傍の分子（すなわちリセプター）を同定したところこれが GPIIIa であった⁴²⁾、ことから証明された。

図 4 Fbg の構造；Fbg は $A\alpha$ 、 $B\beta$ 、 γ の各サブユニットが 2 本ずつ逆平行にジスルフィド結合した構造をしている。図のサブユニット間の細実線は S-S 結合を表している。

一方、抗体や細胞表面標識法を用いた実験によれば、GPIIb/IIIa は、静止状態の血小板表面にも存在しており（約 50,000 分子/血小板）、血小板が刺激を受けると GPIIb/IIIa の Fbg（および他の Big Four）に対する結合部位が活性化されるものと考えられている。この GPIIb/IIIa の“活性化”の実体は未だ不明の点が多いが、タンパク分子のコンホメーションに何らかの違いが生じていることが推定される。実際 GPIIb/IIIa に対するモノクローナル抗体の中には、活性化された分子を特異的に識別するもの（たとえば Pac-1）⁴³⁾も得られている。

b) Fbg の GPIIb/IIIa の結合シグナル

Fbg は、 $A\alpha$ (64 kDa, 610 残基)、 $B\beta$ (56 kDa, 461 残基)、 γ (47 kDa, 411 残基) の 3 本のサブユニット鎖が各 2 本ずつ、互いに N 末端近傍で S-S 結合で架橋された構造 [$(A\alpha)_2(B\beta)_2\gamma_2$] をとっている（図 4 参照）。Hawiger らは、3 本のサブユニット鎖を分離して各サブユニット鎖の血小板との結合部位を調べ、 γ 鎖に無傷 Fbg とほぼ同程度の強い血小板結合活性があることを見出した⁴⁴⁾。また $A\alpha$ 鎖にも γ 鎖より弱いながらもやはり活性が検出された。彼らは、 γ 鎖由来の種々の合成ペプチドの血小板表面のレセプター（すなわち GPIIb/IIIa）への親和性を測定することにより、Fbg の主要な GPIIb/IIIa 結合部位が γ 鎖の C 末端部の 12 残基（ γ 400～411）にあることを見出した⁴⁵⁾。Tranqui らはこの 12 残基の中でも KQAGDV の 6 残基が GPIIb/IIIa に認識されるための最小単位であることを報告している⁴⁶⁾。

面白いことに、 γ 鎖 C 末端由来ペプチドは Fbg ばかりでなく FN や vWF の活性化血小板への結合を阻害する。FN や vWF には、このような γ 鎖 C 末端ペプチド配列は含まれておらず、また FN や vWF の GPIIb/IIIa への結合は前述のごとく、これらの接着分子の RGDS 配列を介して起こることが明らかであるので、この結果は意外であった。この謎は、Ginsburg と Plow らによって、次のように説明された。彼らは、 γ 鎖 C 末端ペプチドを不溶化したカラムに結合した GPIIb/IIIa が、RGDS ペプチドによって溶出されること、逆に、RGDS ペプチドを不溶化したカラムに結合した GPIIb/IIIa は RGDS ペプチドばかりでなく γ 鎖 C 末端ペプチドによっても溶出されることを示し⁴⁷⁾、アミノ酸配列の全く異なるこれら 2 つのペプチドが、(1) GPIIb/IIIa の同一部位に結合する、あるいは、(2) 非常に近傍の 2 つの領域に相互排他的に結合することを提唱した。

一方、Fbg は、 γ 鎖 C 末端のユニークな GPIIb/IIIa 結合配列の他に、FN や vWF と同じ RGDS 配列を $A\alpha$ 鎖の C 末端側 ($A\alpha$ 572～575) に持っており、また、これと類似の RGDF 配列をやはり $A\alpha$ 鎖の N 末端側 ($A\alpha$ 95～98) に持っている。一時期、RGDS ペプチドが Fbg の血小板への結合を阻害することから、 $A\alpha$ (572～575) の RGDS 配列の役割が注目されたが、この配列を欠いた Fbg のプラスミン分解物でも強い RGDS 依存性の血小板結合能を有していることが明らかにされ⁴⁸⁾、その役割については現在、否定的な意見が多い。これに替わ

図5 vWFの構造；vWFのサブユニットはC末端同士(tail to tail)でS-S結合により2量体を形成した後、N末端側のプロペプチド(vWF AgII)が水解・遊離され、次いでN末端側同士(head to head)の結合によって多量体となり血漿中に分泌される。プロペプチドに存在するRGD配列の存在意義は明確でない。

ってRGDF(A α 95~98)の重要性を示す結果が最近得られている。Marguerieらは、FbgのRGDF領域を含む合成ペプチドに対する抗体を作成して、Fbgの血小板への結合に対するこの抗体の阻害活性を調べたところ、血小板へのFbgの結合ばかりでなく洗浄血小板のADP凝集をも強く抑えることを見出した⁴⁹⁾。抗RGDF抗体の阻害活性は、抗 γ (400~411)ペプチド抗体とはほぼ同程度であることから、 γ (400~411)ペプチドとA α (95~98)のRGDFペプチドの両方がFbgの血小板への結合において重要な働きをしているものと考えられる。

IV. von Willebrand 因子 (vWF)

a) vWFと血小板の粘着

vWFは、障害時の血管内皮下組織への血小板の粘着を惹起する主要な細胞接着分子である。BaumgartnerとWeissらのグループは、ウサギ動脈を用いた灌流実験により、vWFに異常をもつ患者の血小板は、血管内皮下組織への粘着が著しく低下していること、この障害は、正常のvWFを移入することにより矯正されることを示し、vWFの血小板粘着における役割を明らかにした⁵⁰⁾。vWFのこの働きは、特にhigh shear rateの条件下で顕著に現れる。血管内皮下組織を構成する主要成分はコラーゲン(Type I, III, IV, V)であるが、vWFは実際にコラーゲンに対し高い親和性を示す。また、vWFは特徴的な多量体構造をとるが、重

合度の高いvWFほどコラーゲンに対する親和性は高く、またそれだけ血小板の粘着を惹起する活性も高いことが報告されている⁵¹⁾。

b) 血小板表面のvWFリセプター

vWFが血小板の血管内皮下組織への粘着を惹起するためには、vWFが血管内皮下組織と同時に血小板表面とも結合することが必要である。vWFはそのために2種類の血小板接着シグナルを備えている⁵²⁾。第1の血小板接着シグナルは、vWF分子のN末端側のドメインに存在し(図5参照)、血小板表面のGPIbと結合する。第2のシグナルは、分子のC末端側に存在するRGDS配列であり、GPIIb/IIIaに結合する。血小板の血管内皮下組織への粘着は、基質表面への血小板のattachment(接着)とそれに続くspreading(伸展)の2つのphaseを含んでいるが、第1のRGD非依存性の接着シグナルは前半のプロセスに不可欠であり、第2のRGDシグナル依存性の接着システムは、後半の伸展に重要であるものと考えられる⁵³⁾。

第1のシグナルを介してvWFが血小板に結合する場合、vWFそれ自身ではGPIb結合能がないので、潜在性のGPIb結合シグナルが“活性化”される必要がある。おそらく、血管内皮下組織に結合することによりvWFのコンホメーションが変化し、GPIb結合シグナルが露出するものと考えられる。非生理的条件下ではリストセチンや蛇毒ボトロセチンの添加によりvWFのGPIb結合シグナルを活性化すること

ができる。また、この場合、第2のRGDSシグナルを介する場合と異なり、血小板の活性化は必要とせず、固定血小板を用いてもvWFの結合が観察される。なおGPIbの欠損を伴うBernard-Soulier症候群の患者の血小板では、リストセチン存在下でのvWFの結合はみられない。

血管内皮下組織に結合したvWFを介して血小板が基質に粘着すると、血小板は活性化され、前述のようにGPIIb/IIIaがRGDシグナルと結合できるようになる。vWFのRGDSシグナルとGPIIb/IIIaとの結合の生理的な意味については不明の点が残っているが、1つには血管内皮下組織への血小板のspreadingの段階に参与している可能性が指摘されている。また粘着に続く凝集の段階においてもvWFの関与を示す実験結果が得られている。De Marcoらは無フィブリノーゲン血症の患者の浮遊血小板がADPやトロンビン存在下である程度凝集すること、この凝集は精製vWFの添加により著しく増強され、また抗vWF抗体の添加により完全に阻害されることを示し、vWFも補助的にGPIIb/IIIaを介する血小板凝集に参与することを推定している⁵⁴⁾。

c) vWFの機能ドメイン構造

vWFは、血小板のGPIbおよびGPIIb/IIIaに結合する2つの接着シグナルの他、コラーゲン、ヘパリン、血液凝固第Ⅷ因子にそれぞれ結合する部位を含む多機能複合ドメインタンパク質である^{52,55)}(図5)。vWFの全一次構造は、タンパク化学的手法とcDNAクローニングの2つの手法の併用により決定され、基本的には4種のモジュールの重複によって出来上がっていることが明らかにされた^{55,56)}。この4種のモジュール(A, B, C, D)と上述のvWFの示す種々の結合活性との対応はこれまでのところあまり明確ではないが、Aモジュールについては、これがコラーゲン結合ユニットとなっている可能性が高い。たとえば、vWFのA1とA3モジュールにはコラーゲン結合活性が認められる⁵⁷⁾。このモジュールは、コラーゲンリセプターであるVLA2にも含まれている⁵⁸⁾。また、このモジュールはMac-1, P150, 95といっ

た白血球接着リセプター分子にも存在するが、これらのインテグリンがコラーゲン結合活性を持つかどうかは不明である。この他、Aモジュールは、ニワトリの軟骨マトリックスタンパク、ヒト補体因子B/C₂、Type IVコラーゲンにも1個または複数個含まれていることが最近明らかにされている。

V. トロンボスポンディン (TSP)

a) 血小板凝集とTSP

TSPは、血小板の α 顆粒に最も豊富に含まれる糖タンパク質で、Fbg, FN, コラーゲン、ヘパリン硫酸、プラスミノゲンなど多彩な生体高分子に親和性を示す⁵⁹⁾。TSPは、FN, Fbg, vWFとは異なり、血液中の>99%が α 顆粒に局在しており、血漿中にはほとんど含まれていない(表1参照)。血小板が刺激を受けて活性化されると、TSPは細胞外へ放出され、血小板表面に結合する。このTSPの結合は血小板無力症の患者の血小板でも正常の血小板と差がないため⁶⁰⁾、TSPの(主要な)リセプターはGPIIb/IIIa以外であると考えられる。AschらはTSPの血小板への結合を阻害する単クローン抗体OKM5が、血小板の分子量88kDaのタンパク質と特異的に結合することを見出した⁶¹⁾。抗体カラムを用いて精製したこの88kDaタンパクは、TSPに特異的に結合し、この結合はEDTAにより完全に阻害された。この88kDaタンパクは血小板の主要な表面糖タンパク質の1つであるGPIIbと同一であることが免疫学のおよび生化学的検証により明らかにされている^{61,62)}。TSPは、サブユニット鎖のC末端側にRGDA配列を持つが、88kDaタンパク(GPIIb)へのTSPの結合は合成RGDSペプチドによって阻害されないため、GPIIbへの結合にはRGDAシグナルは使われていない可能性が高い。また、GPIIbは分子量、サブユニット構成から考えてインテグリンファミリーの一員ではなさそうである。

血小板機能におけるTSPの役割については未だ不明の点も多いが、血小板凝集に積極的に参与していることを示す証拠がいくつか得られている。第1に、抗TSP抗体はトロンビン刺

図 6 TSP の構造

a) TSP 3 量体電子顕微鏡像の模式図。

b) TSP のモジュラー構造. TSP は中央部分に 3 種類の繰り返し構造 (タイプ 1, タイプ 2, タイプ 3) をもつ。

激による血小板凝集を阻害することがいくつかのグループにより報告されている^{63,64}。Leung は、抗 TSP 抗体の存在下では血小板への Fbg の結合の親和性が約 1/4 に低下していることから、TSP は Fbg の GPIIb/IIIa への結合を強めることにより Fbg を介した血小板間の結合を安定化しているものと考えた⁶⁴。第 2 に、TSP 自身が血小板凝集能を持つことが、最近 Tuszyński らにより報告されている⁶⁵。この場合、静止状態の血小板とトロンビン刺激血小板のどちらも TSP により凝集するが、前者の凝集は、抗 GPIIb 抗体で阻害されるのに対して、後者の凝集は阻害されないという。第 3 に、抗 GPIIb 抗体 OKM5 は、トロンビン刺激による洗浄血小板の凝集を強く阻害する⁶¹。また、抗 GPIIb 抗体は血小板の活性化に伴う TSP の細胞表面への出現も同時に阻害した。これらの結果から考えると、活性化に伴って放出された TSP が血小板表面の GPIIb に結合することにより、Fbg の GPIIb/IIIa への親和性が増加し、血小板凝集の安定化がはかられていることが推定される。

b) TSP の機能的ドメイン構造

TSP は、分子量 14 万のサブユニットが 3 本、N 末端側で SS 結合で架橋された三量体構造をとっている。分子の形状を回転蒸着法を用いて電子顕微鏡下で観察すると、図 6-a に模式的に示すごとく、啞鈴 (dumbell) の形をしたサブユニットが 3 本、大球を外に向けて小球付近で連結した構造をとっているように見える⁶⁶。プ

ロテアーゼによる限定分解と種々の TSP に対する単クローン抗体を組み合わせることで、各機能ドメインが分離、同定されているが (図 6-b)、それによると N 末端側の小球はヘパリンに強く結合し、C 末端側の大球には Ca^{2+} 結合部位と血小板結合部位が局在している。また小球と大球をつなぐ柄の部分は、コラーゲンをはじめとして FN, Fbg, ラミニン, プラスミノゲンに結合する活性を有する⁵⁹。TSP の全一次構造は、cDNA の塩基配列から推定されているが⁶⁷、それによれば C 末端側の大球の前半分を構成している 7 個の Ca^{2+} 結合モジュールの最後の 1 つに RGDA 配列が存在している。しかし、この RGDA 配列が、他の RGD 依存性細胞接着分子の場合と同様、細胞接着シグナルとしてインテグリンに認識されるかどうかは明らかではない。

結 語

以上、血小板凝集に関与する 4 つの RGD 依存性細胞接着分子の性質を血小板機能との関係を中心に整理してみた。RGD 依存性細胞接着分子としては、これら Big Four の他にラミニン、ビトロネクチン、コラーゲン、オステオポンティン、テネイシンなどが知られており、この他にもまだまだ未同定のものが多数存在するものと考えられる。これらの細胞接着分子は単に細胞-細胞あるいは細胞-基質 (ECM やフィブリン塊) の接着に関与するだけでなく、細胞の分化や増殖にも深く関わっている可能性が高

い。実際、発生生物学の分野では、コラーゲン、FN、プロテオグリカンといった成分が軟骨細胞や上皮細胞の分化形質の発現に関与していることがよく知られている。また、これらのECMの成分が細胞の増殖の調節にも密接に係わっていることを示唆する結果が最近得られている。Bornsteinらのグループは、表皮増殖因子(epidermal growth factor)による増殖刺激がTSPの添加により数倍増強されること⁶⁸⁾、また血小板由来増殖因子による増殖刺激によってTSPの合成が一過的に誘導されることを報告している⁶⁹⁾。抗TSP抗体は、平滑筋細胞の増殖に対して阻害的に働く。FNやラミニンも、ある種の培養細胞に対しては、増殖を促進する働きがあることが知られている。

インテグリンによるRGD細胞接着シグナルの認識は、単に細胞表層におけるリガンドとリセプターの結合だけにとどまらず、それによって誘導される細胞骨格系の再編成や細胞内情報伝達ネットワークの修飾をも伴う最も基本的な細胞認識システムの1つである。血小板の粘着と凝集は、その中でもリガンドとリセプター分子の構成とその役割が最も詳しく研究されたシステムであり、インテグリンによるRGDシグナルの認識機構を理解する上での格好のモデル系である。

文 献

- 1) Ruoslahti, E., and Pierschbacher, M. D.: *Science* **238**; 491~497, 1987.
- 2) 関口清俊: *細胞工学* **4**; 485~497, 1985.
- 3) 大池康照: *細胞工学* **8**; 5~13, 1989.
- 4) 鈴木 旺: *蛋白質・核酸・酵素* **32**; 1208~1219, 1987.
- 5) 鈴木信太郎: *蛋白質・核酸・酵素* **32**; 1305~1320, 1987.
- 6) 高田義一: *細胞工学* **8**; 14~22, 1989.
- 7) Ginsberg, M. H., and Plow, E. F.: in *Fibronectin* (Mosher, D. F., ed.), 273~293, Academic Press, San Diego., 1989.
- 8) Phillips, D. R., Charo, I. F., Parise, L. V., and Fitzgerald, L. A.: *Blood*, **71**; 831~843, 1988.
- 9) Staatz, W. D., Rafpara, S. M., Wayner, E. A., Carter, W. G., and Santoro, S. A.: *J. Cell Biol.*, **108**; 1917~1924, 1989.
- 10) Sonnenberg, A., Modderman, P. W., and Hogervorst, F.: *Nature*, **336**; 487~489, 1988.
- 11) 松田道生 (1984): *最新医学* **39**; 2030~2033, 1988.
- 12) Colvin, R. B.: in *Fibronectin* (Mosher, D. F., ed.), 213~254, Academic Press, San Diego, 1989.
- 13) 関口清俊: *生化学* **61**; 89~93, 1989.
- 14) Hynes, R.: *Annu. Rev. Cell Biol.*, **1**; 67~90, 1985.
- 15) Kornblihtt, A. R., Umezawa, K., Vibe-Pedersen, K., and Baralle, F. E.: *EMBO J.*, **4**; 1755~1759, 1985.
- 16) Sekiguchi, K., Klos, A. M., Kurachi, K., Yoshitake, S., and Hakomori, S.: *Biochemistry*, **25**; 4936~4941, 1986.
- 17) Zardi, L., Carnemolla, B., Siri, A., Petersen, T., Paoletta, G., Sebastio, G., and Baralle, F. E.: *EMBO J.*, **6**; 2337~2342, 1987.
- 18) Pierschbacher, M. D., and Ruoslahti, E.: *Nature*, **309**; 30~33, 1984.
- 19) Akiyama, S. K., Hasegawa, E., Hasegawa, T., and Yamada, K. M.: *J. Biol. Chem.*, **260**; 13256~13260, 1985.
- 20) Obara, M., Kang, M., and Yamada, K. M.: *Cell*, **53**; 649~657, 1988.
- 21) Maeda, T., Oyama, R., Ichihara-Tanaka, K., Kimizuka, F., Kato, I., Titani, K., and Sekiguchi, K.: *J. Biol. Chem.*, **264**; 15165~15168, 1989.
- 22) Hashino, K., Maeda, T., Kimizuka, F., Kato, I., Titani, K., and Sekiguchi, K.: *Cell Struct. Func.*, in press., 1989.
- 23) Garcia-Pardo, A., Ferreira, O. C., Valinsky, J., and Bianco, C.: *Exp. Cell Res.*, **181**; 420~431, 1989.
- 24) Humphries, M. J., Mervic, M., Yamada, K. M., and Komoriya, A.: *J. Cell Biol.*, **107**, p. 384a, 1988.
- 25) Humphries, M. J., Akiyama, S. K., Komoriya, A., Olden, K., and Yamada, K. M.: *J. Cell Biol.*, **103**; 2637~2647, 1986.
- 26) Pytela, R., Pierschbacher, M. D., and Ruoslahti, E.: *Cell*, **40**; 191~198, 1985.
- 27) Hemler, M. E.: *Immunol. Today*, **9**; 109~

- 113, 1988.
- 28) Springer, T. A., Dustin, M. L., Kishimoto, T.K., and Marlin, S.D. : *Annu. Rev. Immunol.*, **5**; 223~252, 1987.
- 29) Suzuki, S., Argraves, W.S., Pytela, R., Arai, H., Krusius, T., Pierschbacher, M. D., and Ruoslahti, E. : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**; 8614~8618, 1986.
- 30) Kajiji, S., Tamura, R.N., and Quaranta, V. : *EMBO J.*, **8**; 673~660, 1989.
- 31) Pytela, R., Pierschbacher, M. D., Ginsberg, M.H., Plow, E.F., and Ruoslahti, E. : *Science*, **231**; 1559~1562, 1986.
- 32) Pierschbacher, M. D., and Ruoslahti, E. : *J. Biol. Chem.*, **262**; 17294~17298, 1987.
- 33) Houdijk, W. P. M., Sakariassen, K. S., Nivelstein, P.F.E.M., and Sixma, J.J. : *J. Clin. Invest.*, **75**; 531~540, 1985.
- 34) Cohen, I., Potter, E. V., Glaser, T., Entwistle, R., Davis, L., Chediak, J., and Anderson, B. : *J. Lab. Clin. Med.*, **97**; 134~140, 1981.
- 35) Arnson, M.A., Hammerschmidt, D.E., Furcht, L.T., and King, R.A. : *JAMA*, **244**; 144~147, 1980.
- 36) Ginsberg, M. H., Forsyth, J., Lightsey, A., Chediak, J., and Plow, E.F. : *J. Clin. Invest.*, **71**; 619~624, 1983.
- 37) Plow, E. F., McEver, R. P., Collier, B. S., Woods, V. L., Jr., Marguerie, G. A., and Ginsberg, M.H. : *Blood*, **66**; 724~727, 1985.
- 38) Nieuwenhuis, H. K., Akkerman, J. W. N., Houdijk, W.P.M., and Sixma, J.J. : *Nature*, **318**; 470~472, 1985.
- 39) Mustard, J. F., Packham, M. A., Kinlough-Rathbone, R.L., Perry, D. W., and Regoeczi, E. : *Blood*, **52**; 453~466, 1978.
- 40) Bennett, J.S., and Vilaire, G. : *J. Clin. Invest.*, **64**; 1393~1401, 1979.
- 41) Collier, B. S., Peerschke, E. I., Scudder, L. E., and Sullivan, C.A. : *J. Clin. Invest.*, **72**; 325~338, 1983.
- 42) Bennett, J.S., Vilaire, G., and Cines, D. B. : *J. Biol. Chem.*, **257**; 8049~8054, 1982.
- 43) Shattil, S.J., Hoxie, J.A., Cunningham, M., and Brass, L.F. : *J. Biol. Chem.*, **260**; 11107~11114, 1985.
- 44) Hawiger, J., Timmons, S., Kloczewiak, M., Strong, D. D., and Dootittle, R. F. : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **79**; 2068~2071, 1982.
- 45) Kloczewiak, M., Timmons, S., Lukas, T. J., and Hawiger, J. : *Biochemistry*, **23**; 1767~1774, 1984.
- 46) Tranqui, L., Andrieux, A., Hudry-Clergeon, G., Soye, S., Chape, A., Ginsberg, M. H., Plow, E. F., and Marguerie, G. A. : *J. Cell Biol.*, **108**; 2519~2527, 1989.
- 47) Lam, S. C.-T., Plow, E. F., Smith, M. A., Andrieux, A., Ryckwaert, J.-J., Marguerie, G., and Ginsberg, M. H. : *J. Biol. Chem.*, **262**; 947~950, 1987.
- 48) Peerschke, E.I.B., and Galanakis, D.K. : *Blood*, **69**; 950~952, 1987.
- 49) Andrieux, A., Hudry-Clergeon, G., Ryckwaert, J.-J., Chapel, A., Ginsberg, M. H., Plow, E. F., and Marguerie, G. : *J. Biol. Chem.*, **264**; 9258~9265, 1989.
- 50) Weiss, H. J., Baumgartner, H. R., Tschopp, T.B., Turitto, V. T., and Cohen, D. : *Blood*, **51**; 267~279, 1978.
- 51) Sixma, J.J., Sakariassen, K.S., Beeser-Visser, N.H., Ottenhof-Rovers, M., and Bolhuis, P. A. : *Blood*, **63**; 128~136, 1984.
- 52) 藤村吉博 : 血液と脈管 **20**; 1~12, 1989.
- 53) Weiss, H. J. : in *Coagulation and Bleeding Disorders: The Role of Factor VIII and von Willebrand Factor* (Zimmerman, T. S. and Ruggeri, Z. M., eds.), 195-213, Marcel Dekker, New York, 1989.
- 54) De Marco, L., Girolami, A., Zimmerman, T. S., and Ruggeri, Z.M. : *J. Clin. Invest.*, **77**; 1272~1277, 1986.
- 55) Titani, K., and Walsh, K. A. : *Trends Biochem. Sci.*, **13**; 94~97, 1988.
- 56) Titani, K., Kumar, S., Takio, K., Ericsson, L. H., Wade, R. D., Ashida, K., Walsh, K. A., Chpek, M.W., Sadler, J.E., and Fujikawa, K. : *Biochemistry*, **25**; 3171~3184, 1986.
- 57) Kalafatis, M., Takahashi, Y., Girma, J.-P., and Meyer, D. : *Blood*, **70**; 1577~1583, 1987.
- 58) Takada, Y., and Hemler, M.E. : *J. Cell Biol.*

- 108 ; 397~407, 1989.
- 59) Frazier, W.A. : J. Cell Biol., **105** ; 625~632, 1987.
- 60) Aiken, M.L., Ginsberg, M.H., and Plow, E. F. : J. Clin. Invest., **78** ; 1713~1716, 1986.
- 61) Asch, A. S., Barnwell, J., Silverstein, R. L., and Nachman, R. L. : J. Clin. Invest., **79** ; 1054~1061, 1987.
- 62) McGregor, J.L., Catimel, B., Parmentier, S., Clezardin, P., Dechavanne, M., and Leung, L. L.K. : J. Biol. Chem., **264** ; 501~506, 1989.
- 63) Dixit, V. M., Haverstick, D. M., O'Rourke, K.M., Hennessy, S.W., Grant, G.A., Santoro, S. A., and Frazier, W. A. : Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **82** ; 3472~3476, 1985.
- 64) Leung, L.L.K. : J. Clin. Invest., **74** ; 1764~1772, 1984.
- 65) Tuszyński, G.P., Rothman, V.R., Murphy, A., Seigler, K., and Knudsen, K.A. : Blood, **72** ; 109~115, 1988.
- 66) Galvin, N.J., Dixit, V.M., O'Rourke, K.M., Santoro, S.A., Grant, G.A., and Frazier, W. A. : J. Cell Biol., **101** ; 1414~1422, 1985.
- 67) Lawler, J., and Hynes, R. O. : J. Cell Biol., **103** ; 1635~1648, 1986.
- 68) Majack, R. A., Cook, S. C., and Bornstein, P. : Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **83** ; 9050~9054, 1986.
- 69) Majack, R.A., Goodman, L.V., and Dixit, V. M. : J. Cell Biol. **106** ; 415~422, 1988.
- 70) Wayner, E.A., and Carter, W.G. : J. Cell Biol., **105** ; 1873~1884, 1987.
- 71) Kunicki, T. J., Nugent, D. J., Staats, S. J., Orzechowski, R.P., Wayner, E.A., and Carter, W. G. : J. Biol. Chem., **263** ; 4516~4519, 1988.
-