

表 題 細胞内蛋白質 Paxillin がマウス血小板活性化に果たす役割
Paxillin is an intrinsic negative regulator of platelet activation in mice

論文の区分 博士課程

著 者 名 坂田 飛鳥

担当指導教員氏名 大森 司 講師

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
地域医療学系 専攻
血液・免疫疾患学 分野
止血血栓学

2014年1月10日申請の学位論文

目次

はじめに	pp.	2-3
第1章 背景	pp.	4-13
第1節 血小板活性化	pp.	4-6
第2節 インテグリン活性化	pp.	7-8
第3節 細胞骨格蛋白質 Paxillin	pp.	9-11
第4節 RNA 干渉	pp.	12-13
第2章 研究報告	pp.	14-50
第1節 研究目的	p.	14
第2節 研究方法	pp.	15-24
第3節 結果	pp.	25-45
第4節 考察	pp.	46-50
おわりに	p.	51
引用文献	pp.	52-57
謝辞	p.	58

はじめに

生体は血管内の血液を介し、シグナル伝達、酸素運搬、エネルギー運搬を行うことで、ホメオスタシスを維持している。血管内における血液の流動性は、主として血管内皮細胞により維持されている。血管内皮細胞はトロンボモジュリン、組織型プラスミノゲンアクチベーター、プロスタサイクリン、一酸化窒素 (NO)、などの抗凝固作用物質、血小板機能抑制物質、線溶活性化物質を発現・分泌することで、血液を抗血栓性のベクトルで調節している。一方、出血部位では、このベクトルは速やかに向血栓性に傾き、血管収縮、及び血小板や凝固因子が関与する止血反応により、局所の出血を最小限にする。以下にこの止血反応について概説する。

血管内皮が損傷し、内皮下組織であるコラーゲンが露出すると、ここに血管壁近傍を流れていた血小板が接着する (図 1A)。血管内皮破綻部位で活性化された血小板は局所で凝集塊を形成し、あたかも決壊した堤防で水の漏出を防ぐ土嚢のように障害部位をすみやかに塞ぐ。これが血小板による一次止血栓である (図 1B)。血小板のみによる止血栓は脆弱であるため、土嚢で作った土台にセメントで堤を作るように、血小板を反応の場として凝固因子が活性化されフィブリンによる二次止血栓が形成される (図 1C)。生成された血栓は、線溶反応により組織修復とともに適切な大きさに溶解される (図 1D)。

この止血栓形成は、外傷に対しての生体防御機構であるが、逆に血栓形成によって血流が途絶し、末梢組織の虚血・壊死を引き起こしてしまう場合がある。末梢組織の虚血・壊死すなわち梗塞は心筋梗塞や脳梗塞など致命的な病態を呈し、QOLを阻害する後遺症を引き起こすため、これらの疾患では抗血小板薬、抗凝固療法、あるいは線溶療法などの止血機構を修飾する薬剤による治療・予防が行われる。止血機構の詳細なメカニズムの解明は、出血性疾患の病態生理だけでなく、新規抗血栓薬なら

びに止血薬の開発にも結びつくと考えられる。本研究では、血栓形成の初期段階である血小板活性化メカニズムについて、細胞内骨格蛋白質である Paxillin に着目し、その血栓形成における機能を網羅的に検討した。

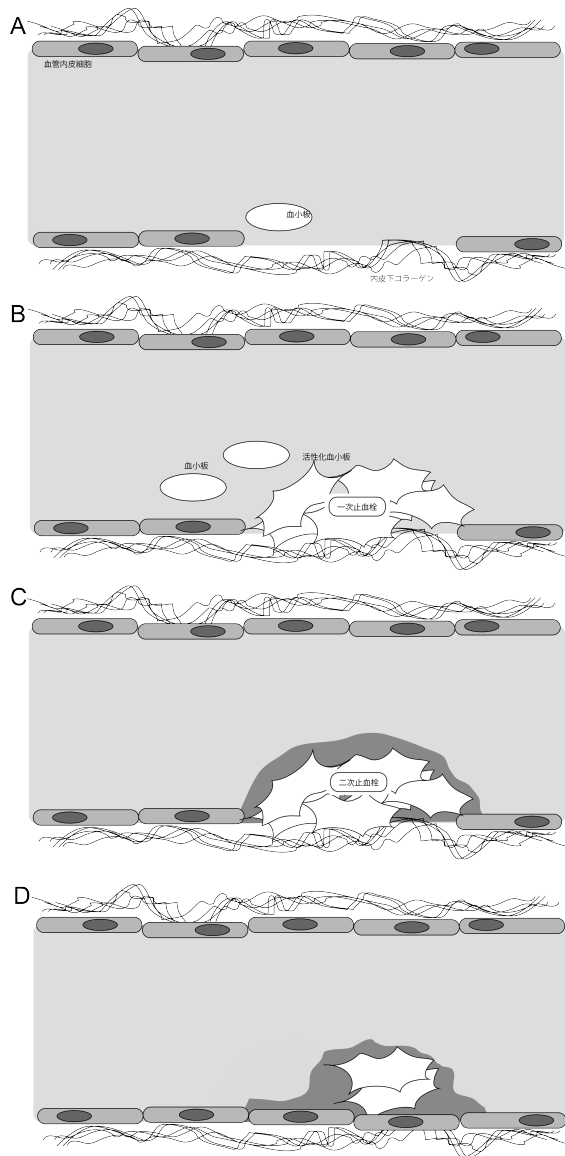


図 1. 血管内皮損傷と血栓形成

A) 血管内皮損傷：血管内皮の破綻部位に血小板が集まり接着が起こる。B) 一次止血栓の形成：血管破綻部位で血小板が活性化され、損傷部位を塞ぐ血小板血栓が形成される。C) 二次止血栓の形成：活性化血小板膜を反応の場として凝固因子が活性化され、フィブリン血栓が形成される。D) 線溶反応：血管内皮の修復とともに、フィブリン血栓はプラスミンにより分解され、血栓が適切な大きさに調節される。

第1章 背景

第1節 血小板活性化シグナル伝達

血小板は直径 2-4 μm の無核の血球細胞で一次止血反応に関与する。外的、または内的な要因で血管壁が破綻すると血管内皮細胞下のコラーゲンが露出する。露出したコラーゲンには血漿中のフォンヴィレブランド因子 (von Willebrand factor : VWF) が結合し、一端を固定された VWF は高ずり応力下で形態を変化させ、血小板上の VWF 受容体である GPIIb/IIIa/V 複合体を介して血小板を血管損傷部位にトラップする¹。局所にトラップされた血小板は、膜上のコラーゲン受容体 $\alpha_2\beta_1$ より活性化シグナルが伝達され、Fyn などの Src ファミリーチロシンキナーゼにより $\alpha_2\beta_1$ に結合した Fc 受容体 γ 鎖がリン酸化される。さらに Syk・LAT などに下流シグナルが伝達され、ホスホリパーゼ C (phospho lipase C : PLC) γ_2 が活性化する。PLC の活性化はイノシトール三リン酸による細胞内 Ca^{2+} 動員とジアシルグリセロールによるプロテインキナーゼ C (protein kinase C : PKC) 活性化を引き起こす^{2 3} (図 2)。血小板活性化シグナルが伝達されると、トロンボキサン (thromboxane : TX) A_2 や ADP, セロトニン等の物質が細胞外に放出され、これらが血小板膜上の特異的受容体を介し自身と周囲の血小板をさらに活性化させる⁴ (図 3)。この放出物質を介した血小板活性化増幅シグナルには種々な G 蛋白質共役型の受容体に関与する。G 蛋白質共役型受容体は 7 回膜貫通型受容体でアゴニスト刺激シグナルを三量体 G 蛋白質を介して細胞内に伝達する (図 2)。アゴニスト刺激により活性化された三量体蛋白質の一つである G_q は $\text{PLC}\beta$ を活性化させることで細胞内 Ca^{2+} 動員と PKC 活性化を引き起こす。また G_i からのシグナルは cAMP の低下を介して、持続的な血小板活性化シグナルを伝達する⁵。

上述の細胞内シグナルに反応して、最終的に GPIIb/IIIa (インテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$) の活性化が起こり、そのリガンドであるフィブリノゲンや VWF を介して血小

板凝集が生じる⁶。上流のシグナルとインテグリン活性化を結ぶ共通のシグナル伝達経路として低分子量 G 蛋白質である Rap1b が知られている⁷。Rap 1b は細胞増殖、細胞接着等の複数の細胞機能を担う低分子量 G 蛋白質である。Rap family として Rap1a, 1b, そして Rap2a, 2b, 2c の 5 つの存在が知られており、血小板には主に Rap1b が存在している。Rap1b は Ca^{2+} and diacylglycerol-regulated GEF I (CalDAG-GEF1) の作用で GTP 結合型となり活性型となる。活性化された Rap1b は Rap1-interacting-adaptor molecule (RIAM) の Talin への結合を引き起こし、RIAM と結合した Talin はインテグリン β サブユニットへ結合し、インテグリンを活性化させる⁷ (図 4)。Rap1b ノックアウトマウスの血小板はインテグリン発現が正常であるにも関わらず、凝集反応と放出反応が障害されている⁸⁻⁹。また Rap1b を活性化させる CalDAG-GEF1 のノックアウトマウス血小板も同様の特徴を示し、トロンボキサン合成能も低下している¹⁰。

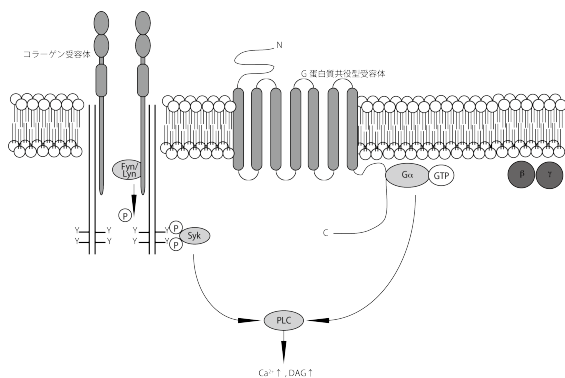


図 2. コラーゲン受容体と G 蛋白質共役型受容体

コラーゲン受容体 GPVI はチロシンキナーゼを介したシグナル伝達により血小板を活性化させる。Fc 受容体 γ 鎖が Fyn や Lyn などのチロシンキナーゼによりリン酸化され、リン酸化部位に Syk が結合する。活性化された Syk は $\text{PLC}\gamma 2$ の活性化シグナルを伝達する。一方、血小板でから放出されるセロトニン、ADP、 TXA_2 等の受容体は G 蛋白質共役型受容体である。アゴニスト刺激により活性化された受容体では三量体 G 蛋白質 $\alpha\beta\gamma$ の α と $\beta\gamma$ の結合が解かれ、 $\text{G}\alpha$ により $\text{PLC}\beta$ が活性化される。

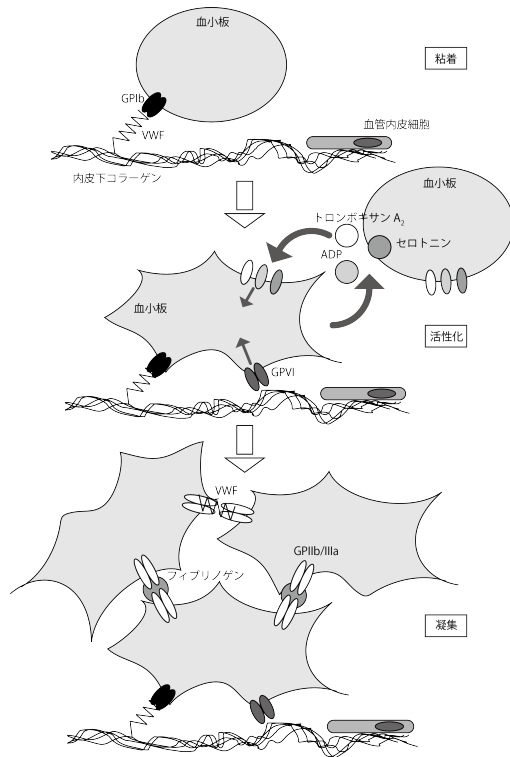


図 3. 血小板凝集塊の形成

血管内皮下コラーゲンにVWFを介して接着した血小板はコラーゲン受容体からの活性化シグナルを受け、放出反応を起こす。放出された血小板活性化物質はオートクライン、パラクライン的に血小板活性化を引き起こす。活性化されたGPIIb/IIIa（インテグリン α IIb β 3）はVWFやフィブリノゲンと会合し、血小板凝集塊を形成する。

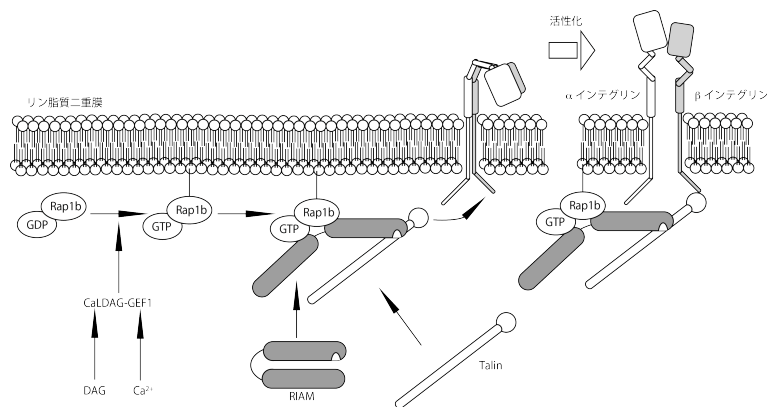


図 4. インテグリン活性化における Rap1b の役割

Rap1b-GDPはCaLDAG-GEF1により活性化型のRap1b-GTPとなる。活性化したRap1bは、Rap1-interacting-adaptor molecule (RIAM)を介してTalinと結合する。RIAMと結合したTalinはインテグリン β サブユニットと結合し、インテグリン活性化を引き起こす。

第2節 血小板インテグリン活性化機構

インテグリンは細胞表面上に存在する膜糖蛋白質で、細胞外マトリックスの受容体として機能する¹¹。インテグリンは相異なった α サブユニットと β サブユニットが非共有結合で会合したヘテロ二量体である。 α サブユニットと β サブユニットの組み合わせにより、その結合するリガンドの種類は決定され¹²、組織により発現するインテグリンが異なる¹³。リガンドの性質によりコラーゲン結合インテグリン、ラミニン結合インテグリン、RGD 認識インテグリンに分けられる。現在までに 18 の α サブユニットと 8 の β サブユニットの存在が明らかとなっており、異なる 24 のヘテロ二量体が確認されている。血小板に特異的に発現するインテグリンはインテグリン α IIb β 3 で GPIIb/IIIa と呼ばれる。血液中のフィブリノゲンや VWF をリガンドとする血小板凝集に必須の膜糖蛋白質である。インテグリン α IIb β 3 の先天性欠損は出血傾向を引き起こす血小板無力症として知られる¹⁴。

血小板インテグリンはリガンドとなるフィブリノゲンや VWF と効率良く結合するために、その構造を高親和性へと変化させる。このインテグリンのリガンド結合能を増強させるシグナルを inside-out signaling と呼ぶ。一方で、リガンド結合後に生じるインテグリンから細胞内へのシグナル伝達を outside-in signaling と呼ぶ^{15,16}。血液流動中では血小板インテグリン α IIb β 3 は血小板凝集が起きないように、そのリガンド結合能を低親和性としている。この状態ではインテグリン α IIb β 3 の細胞外ドメインは内側に折りたたまれるような形で存在している。血栓形成部位で血小板が活性化すると inside-out signaling により構造変化を起こし、リガンドとの結合を高親和性に変化させる(図5)。リガンドと結合した α IIb β 3 は、outside-in signaling により、細胞骨格再編成を引き起こし、局所の血小板血栓を強固なものとする。

インテグリン構造変化はインテグリン β 鎖と細胞内蛋白質との会合により引

き起こされる。これに重要な役割を果たす蛋白質として Talin と Kindlin が知られている。Talin は ~ 270 kDa の巨大な蛋白質で N 末端の 47 kDa の head ドメインと C 末端の ~ 220 kDa の rod ドメインからなる。インテグリンの構造変化は Talin の N 末端が β インテグリンの細胞質ドメインの NPxY モチーフに結合することによる。この結合が、近接して存在していた α サブユニットと β サブユニットを引き離し、インテグリン構造変化の引き金をひく (図 5)。Kindlin はそれ自身がインテグリン構造変化を引き起こすことはないが、 β インテグリンの細胞質ドメインの NxxY モチーフに結合することにより Talin による構造変化を容易にしていると考えられている¹⁷。これらの蛋白質を欠損するノックアウトマウスの血小板は、血小板凝集が障害され、血小板無力症様の所見を呈する^{18 19}。また、ヒト白血球インテグリン及び血小板インテグリン機能不全による免疫不全・出血傾向を来す leukocyte adhesion deficiency-III が Kindlin3 の先天的異常によることが知られている^{17 20}。

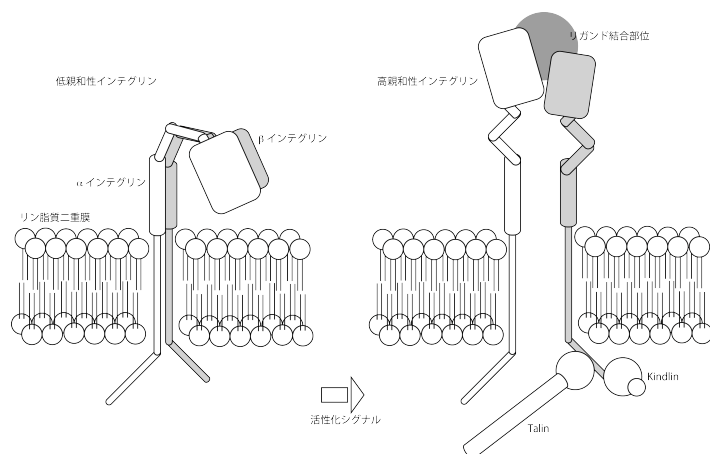


図 5. インテグリン活性化と親和性変化

インテグリンは通常 α 、 β サブユニットが近接して存在した形態で存在する。頭部は折りたたまれ、リガンドとの結合部位は表面に露出していない。活性化シグナルに伴い、細胞質ドメインに複数の蛋白質、特に、Talin と Kindlin が結合することで α 、 β サブユニットが解離し、インテグリンは構造変化を起こす。構造変化をしたインテグリンは頭部のリガンド結合部位を表面に突出させ、リガンドとの親和性が増加する。

第3節 細胞骨格蛋白質 Paxillin

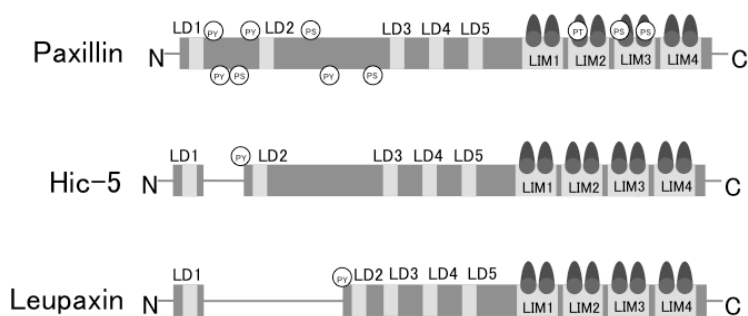
Paxillin は 68 kDa の蛋白質で *v-src* を形質導入した細胞内でチロシンリン酸化をうける蛋白質として見いだされた²¹。動物種間で良く保存された蛋白質で多くの細胞に広く発現している^{22 23}。Paxillin のチロシンリン酸化は他にインテグリンを介した接着や成長因子との反応に伴い観察される²⁴。構造上の特徴として N 末端の 5 つの LD モチーフと C 末端の zinc finger 構造である 4 つの LIM (Lin-11, Isl-1, Mec-3) ドメインがある^{25 26 27}。その他, N 末端近傍にはプロリンリッチドメインが存在し, Src や Crk family と結合する²⁸。LIM ドメイン, LD モチーフを共通構造として持つ蛋白質に Hic-5, 白血球に発現する Leupaxin が存在し, Paxillin family と呼ばれている^{26 27} (図 6)。ヒト血小板では Paxillin の発現が認められない一方で, Hic-5 の発現が認められる。巨核球分化の各段階では Paxillin の発現が主要であるが, 成熟血小板では Hic-5 のみの発現となる^{29 30}。これに対し, マウス血小板では Hic-5 とともに Paxillin の発現が認められることが報告されている³¹。Paxillin と Hic-5 は C 末端の LIM ドメインや N 末端の LD モチーフといった共通構造の相関性が高い一方で, それ以外の部分には相違点も多く, Paxillin と Hic-5 は細胞伸展において相反する機能を見せる^{32 33}。

LD モチーフの反応相手としてアクチン結合蛋白質, リン酸化酵素群, 細胞内移送に関わる ARF family GTPase の活性化蛋白質 (ARF-GAPs) 等多くの蛋白質が知られている³⁴。一方, LIM ドメインは動物種間でよく保存された構造にもかかわらず, その反応相手は限られたものしか知られていない。それら報告でこの部位が接着斑 (focal adhesion plaque) における Vinculin やチロシン脱リン酸化酵素 PTP-PEST の会合に重要な部位であることが明らかとされた^{35 36 23}。

インテグリン細胞質ドメインと Paxillin の直接結合は $\alpha 4$ インテグリンと $\alpha 9$

インテグリンで確認されており^{37 38} (α II β , α 3A, α 5, α 6A では認められていない), α 4 インテグリンと Paxillin の結合阻害が白血球の炎症部位への遊走を阻害することが知られている³⁹. これらの研究結果から現在 Paxillin はインテグリン α サブユニット細胞質ドメイン近傍で様々な蛋白質のアダプター蛋白質となることで細胞内シグナル伝達に寄与していると考えられている (図7) .

Paxillin ノックアウトマウスはフィブロネクチンノックアウトマウスと類似の表現型をとる. 中胚葉由来の心や体節の発生障害を認め, 生存して出生するマウスは存在しない⁴⁰. 胎仔由来の繊維芽細胞を用いた検討で接着斑の形成並びに仮足形成に Paxillin は必須で無いが, そのターンオーバーに Paxillin が必須であることが明らかにされた⁴¹. ショウジョウバエ Paxillin をエンハンサートラップの手法により強発現させた実験では幼虫期早期の強発現で全例が死亡した. 幼虫期末期の Paxillin 強発現では多くは蛹の段階で死亡してしまったが, 少数生存例が認められた. これらの成虫は FAK を強発現させたショウジョウバエの表現型と類似した足の形成異常と水疱の出来た羽根という表現型を呈した. 水疱形成を伴う羽根の形成はインテグリン変異のあるショウジョウバエでも報告されている. 前蛹段階では羽根は上皮一枚のシートからなり, インテグリンはこの制御をされると考えられている. 発生が進むとこのシートは背側と腹側に折りたたまれ, この段階ではインテグリンは両者を接合させる役割を担う. Paxillin や FAK の発現異常は, このインテグリンシグナルの障害により羽の水疱形成を引き起こすと考えられる⁴².



Associated molecule

LD1 : Actopaxin, Vinculin

LD2 : Vinculin, Focal adhesion kinase (FAK)

LD4 : Vinculin, FAK

G-protein coupled receptor kinase interacting protein (GIT)

図 6. Paxillin family

Paxillinは68 kDaのリン酸化部位を持つ蛋白質である。構造の特徴としてLDモチーフとLIMドメインがある。同様の構造的特徴を持つHic-5, LeupaxinとともにPaxillin familyと呼ばれる。

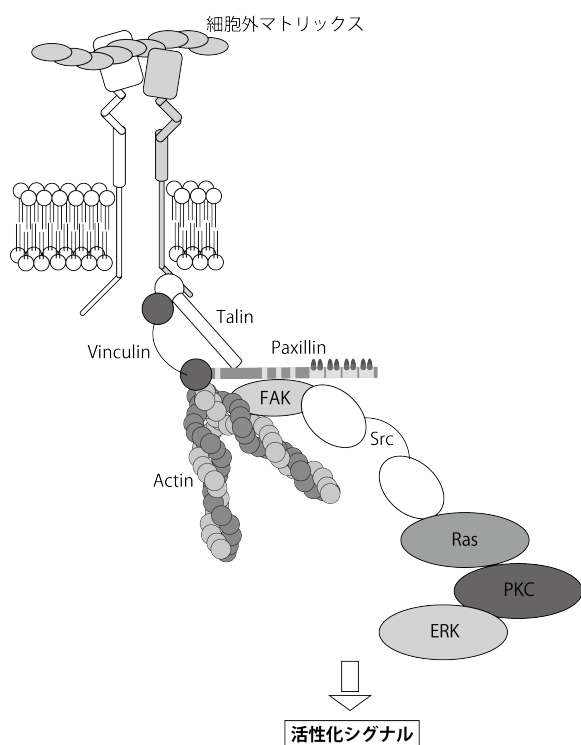


図 7. インテグリン細胞質ドメイン近傍の蛋白質と活性化シグナル伝達の一例
Paxillinはインテグリン細胞質ドメイン近傍にTalinやVinculinとともにシグナルコンプレックスを構成し、インテグリンからの細胞の進展や細胞増殖、細胞移動等のシグナルを伝達する。

第4節 RNA 干渉

RNA 干渉 (RNAi) は線虫により発見された遺伝子発現調節機構である⁴³。その後、哺乳類でも miRNA による生理的発現制御機構が存在することが明らかとなった⁴⁴。

RNAi の発現系を用いると、簡便に目的蛋白質の抑制が可能となる。プラスミドベクターやウィルスベクターなどにより発現させた short hairpin RNA (shRNA) は Dicer と呼ばれる酵素によって 22 塩基程度の 2 本鎖 RNA に切断される。続いて、小分子 RNA 複合体である Argonaute と結合し、1 本鎖化され、RNA-induced silencing complex (RISC) を形成する。RISC は、そのスライサー活性により標的 RNA を切断する (図 8)。

レンチウイルスベクターを用いた shRNA 導入による RNAi は標的塩基配列さえ明らかであれば比較的簡便に効率良く蛋白質発現を抑制することができる。また、ノックアウト生物の利用できないヒト細胞にも応用可能であることなど利点が多く、基礎研究領域において一般的なツールとして利用されている。また我々は、マウスにレンチウイルスベクターで shRNA を発現させた造血幹細胞の移植を行うと、無核の血小板でも標的蛋白質の抑制が可能となることを報告した⁴⁵。この手法を用いることで、ノックアウトマウスを作成することなく、目的蛋白質の血小板機能評価が可能である。

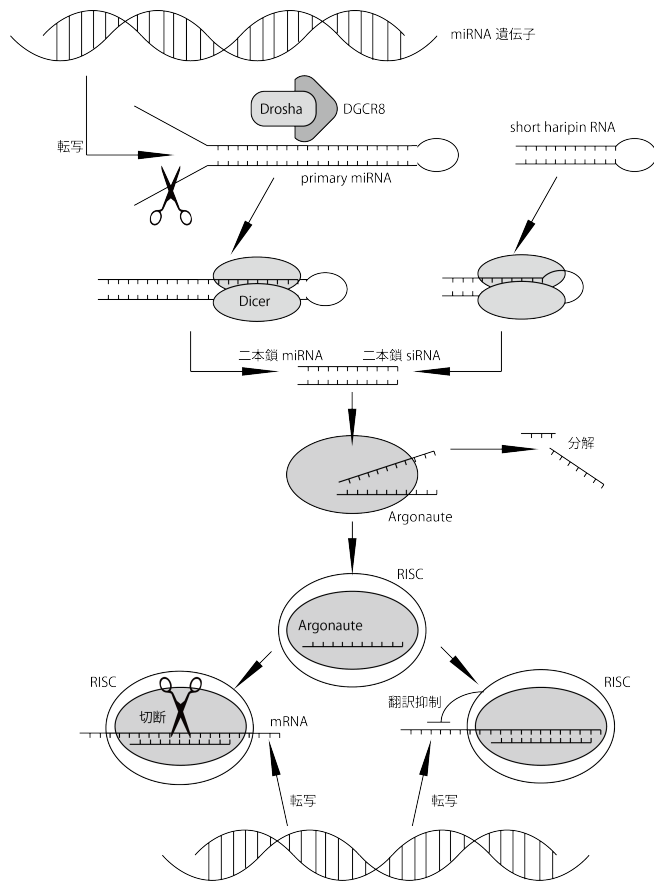


図 8. RNA 干渉

ウィルスベクターにより導入された shRNA は Dicer により二本鎖 siRNA へとプロセッシングされる。二本鎖 siRNA は Argonaute と結合し，RNA-induced silencing complex (RISC) の中核を成す。RISC 中で Argonaute-RNA 複合体は mRNA の切断酵素として機能する。

第2章 研究報告

第1節 研究目的

過去の研究から Paxillin はインテグリン近傍の接着斑において、複数の蛋白質に反応の場を提供することにより、その機能制御を行っていると考えられる。Paxillin を欠如したマウス繊維芽細胞は細胞接着後の遊走が障害される⁴⁰。さらに、Paxillin と $\alpha 4$ インテグリンとの結合阻害により炎症部位への白血球の遊走が障害されるという報告もあり³⁹、総じて Paxillin はインテグリン outside-in シグナルを正に調整し、細胞運動、創傷治癒に関与している。

冒頭で述べたようにインテグリンは血小板の凝集反応に必須の蛋白質である。インテグリンの機能は、様々な細胞内蛋白質により制御されている。特に Talin や Kindlin によるインテグリン構造変化機構がリガンド親和性を変化させることは有名であるが^{17 15,18 19}、他の蛋白質が如何にインテグリン機能に影響を及ぼすかについては良く知られていない。新規のインテグリン活性化機序の解明は、新たな抗血栓薬の開発にも結びつくとも考えられる。我々は他の細胞においてインテグリン機能に重要と報告されている Paxillin family member に着目した。ヒト血小板では巨核球分化の最終段階で、Paxillin から Hic-5 への発現変化が生じることが報告されている^{29 30}。一方、マウス血小板では Paxillin, Hic-5, Leupaxin いずれも発現を認める³¹。我々は、これらの Paxillin family member 蛋白質が血小板の機能に何らかの役割を担っているという仮説を立てた。本研究では、過去に当教室で確立した RNAi の手法を用いて⁴⁵、マウス血小板の Paxillin をノックダウンし、生体の一次止血栓形成への Paxillin の関与、ならびにその機序について明らかにすることを目的とした。

第2節 研究方法

2-1 cDNA クローニング

マウス骨髄 RNA で Prime script RT (TakaraBio Co., shiga, Japan) により逆転写反応を行い, 下記プライマーの組み合わせを用いてそれぞれの cDNA を PCR 法によりクローニングした. 用いた酵素は PfuUltra High Fidelity DNA polymerase (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) で, アニーリング 55°C, 伸長反応 72°C の条件で Gene Amp PCR system9700 (Applied Biosystems Inc., Carlsbad, CA) を用い増幅反応を行った. PCR により増幅された cDNA はクローニングベクターである pCR-bluntII TOPO (Invitrogen Co., Carlsbad, CA) にそれぞれ挿入した. GFP と Talin FERM ドメインの融合蛋白質は pEGFP-C plasmid (Clontech Laboratories Inc., Mountain View, CA.) に cDNA を挿入し作製した.

cDNA (Gen Bank Accession Number)	Sequence
For cDNA cloning	
Mouse Paxillin (NM_011223.2)	F 5' -CGTCTGAGGACCAGCCATGGA-3' R 5' -CACCGCCTAGCAGAAGAGCTT-3'
Mouse Talin-1 FERM domain (AK_147228)	F 5' -CCATGGTTGCGCTTTCGCTGAAG-3' R 5' -TCATCGGTGCATCTGGCCACTGGTGAT-3'
Mouse Rap1b (NM_024457.2)	F 5' -CCATGCGTGAATATAAGCTCG-3' R 5' -TTAAAGCAGCTGACACGATGAC-3'
RalGDS-RBD (NM_009058.1)	F 5' -TCACTGCCTCTCTACAACCA-3' R 5' -TTAGAAGATGCCTTGGCAATCC-3'

表 1. クローニングに用いたプライマーペア

2-2 レンチウイルスベクターの作製

ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus : HIV) からウイルスの自己増幅に必要な部位を失わせた第3世代レンチウイルスベクターを作製するプラスミドである pLL3.7 を American Type Culture Collection (Manassas, VA) より購入した。このベクターは U6 プロモーターにより shRNA を発現させると同時にサイトメガロウイルス (CMV) プロモーターで感染細胞を GFP ラベルできる特徴を持つ。今回の実験では感染細胞由来の血小板特異的に効率よく GFP をラベルする目的で CMV プロモーターを血小板特異的プロモーターである GPIb α プロモーターに置換した⁴⁵。マウス Paxillin に対する shRNA 配列は Dharmacon RNA Technologies (<http://www.dharmacon.com/>) が提供するアルゴリズムで作製し、その中から3つの配列を選択した。選択した配列を Invitrogen で合成し、pLL3.7 の HpaI と XhoI の間に挿入した (図 9A)。

水疱性口内炎ウイルスの G 糖蛋白質 (vesicular stomatitis virus G-glycoprotein: VSV-G) にシュードタイプ化したレンチウイルスベクターは 293T 細胞へのトランスフェクションにより作成した。293T 細胞に pLL3.7 とともにパッケージングプラスミド pLP1 (Gag-Pol) , pLP2 (Rev) , pVSVG (VSV-G) を Lipofectamine (Invitrogen) で導入した。遺伝子導入後 48 時間後と 72 時間後に、細胞上清を回収した。回収した細胞上清は 0.45 μ m のフィルターでろ過後に 51,268 x g で 2 時間遠心し 200 倍にウイルス含有上清を濃縮した。作製したレンチウイルスはマウス胚線維芽細胞 (MEF) に感染させ、感染後 48-72 時間経過した細胞の溶解液で immunoblotting を行い、最も強く発現を抑制した配列 (Pxn-1) を以降の実験に採用した (表 2, 図 B, C)。

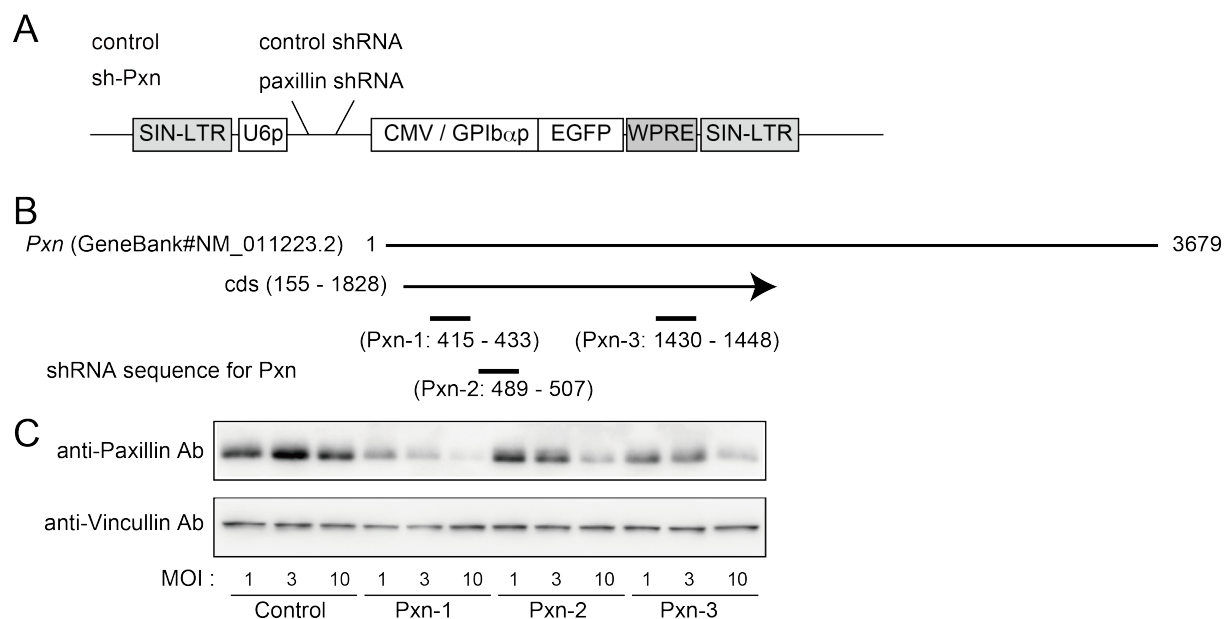


図 9. Paxillin に対する shRNA 配列の決定

- A) レンチウィルベクターは U6 プロモーターによる short hairpin (sh) 配列発現と同時に GPIb α プロモーターで GFP を発現する構造を持つ。
- B) shRNA 配列は Dharmacon 社が提供するアルゴリズムで設計した。Paxillin の mRNA に対する標的部位は図に示す通りである。3 つの配列を選択し pLL3.7 に挿入した。
- C) MEF 細胞に作製したウィルスベクターを感染させ、48-72 時間後に回収した細胞の溶解液を抗 Paxillin 抗体 (上段) 又は抗 Vincullin 抗体 (下段) で immunoblotting を行った。

siRNA		Sequence
control	sence	5'- TGCTCGAATAGTACTAGAGTTTCAAGAGAGCTCTAGTACTATTCGAGCTTTTTTC -3'
	antisence	5'- TCGAGAAAAAAGCTCGAATAGTACTAGAGCTCTCTTGAAACTCTAGTACTATTCGAGCA -3'
Pxn-1	sence	5'- TGTACAGCTCCAGTGCTAAATTCAGAGATTTAGCACTGGAGCTGTACTTTTTTC -3'
	antisence	5'- TCGAGAAAAAAGTACAGCTCCAGTGCTAAATCTCTTGAATTTAGCACTGGAGCTGTACA -3'
Pxn-2	sence	5'- TGCGAGGAAGAGCACGTCTATTCAGAGATAGACGTGCTCTTCCTCGCTTTTTTC -3'
	antisence	5'- TCGAGAAAAAAGCGAGGAAGAGCACGTCTATCTCTTGAATAGACGTGCTCTTCCTCGCA -3'
Pxn-3	sence	5'- TGGCAAAGCGTACTGTCTGCTATTCAGAGATACGACAGTACGCTTTGCCTTTTTTC -3'
	antisence	5'- TCGAGAAAAAAGCAAAGCGTACTGTCTGCTATCTCTTGAATACGACAGTACGCTTTGCCA -3'

表 2. 実験に使用した shPxn 配列

2-3 マウス骨髄細胞への感染と骨髄移植

全てのマウス飼育および取り扱いには自治医科大学動物実験委員会の実験動物取り扱い指針に沿って行った。C57BL/6J マウスは日本 SLC (Shizuoka, Japan) より購入した。マウス骨髄細胞はドナーマウスの大腿骨と脛骨から採取し、100 ng/ml の stem cell factor , thrombopoietin, interleukin-6, fms-like tyrosine kinase3 ligand, 及び 200 ng/ml soluble IL-6 receptor を含む StemPro-34 SFM medium (Invitrogen) に懸濁した。12-16 時間後にレンチウイルスベクターをポリブレン 8 µg/ml の存在下に multi publicity of infection (MOI) : 5 で添加し、6 時間インキュベーションした後に StemPro-SFM medium を 30 ml 加えた。16 時間後に細胞を回収し、ガンマセル (Norton International, ON , Canada) で 9.5Gy 放射線照射した C57BL/6J マウスに 2×10^6 細胞を静注した (図 10)。

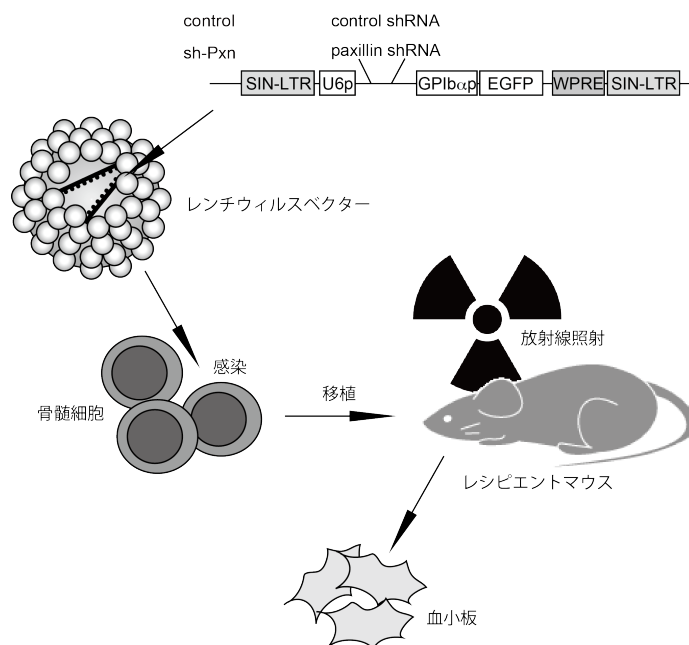


図 10. RNA 干渉を利用したノックダウン血小板の作製

U6 プロモーターによる shRNA 発現と同時に、GPIb α プロモーターで EGFP を発現するレンチウイルスベクターを骨髄細胞に感染させた。感染骨髄細胞を放射線照射したレシピエントマウスに移植すると、移植した骨髄細胞由来の血小板で目的蛋白質の抑制が可能となる。

2-4 マウス洗浄血小板の作製

移植 4-5 週後にマウス右頸静脈より採血を行った。採血には 30G の針を用い、採血予定量の 1/10 量 3.8 %クエン酸ナトリウムを入れた注射器で 100-400 μ l を採取した。血液は 3 ml の HEPES/Tyrode バッファー (138 mM NaCl, 3.3 mM NaH₂PO₄, 2.9 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mg/ml of glucose, 20 mM HEPES pH7.4) で希釈し、120 x g で 8 分間の遠心後、血小板が含まれる血漿分画を 0.1 μ M のプロスタグランジン I₂ と 15% acid-citrate-dextrose A を加えた HEPES/Tyrode バッファーで洗浄した。

2-5 電子顕微鏡

マウス血小板は glutaraldehyde を 2%含量する 0.1 M リン酸バッファーで 4°C, 60 分間反応させた。反応させた血小板は洗浄後、酸化オスミウムを 1%含量する 0.1 M リン酸バッファーで再び 4°C, 60 分間反応させ固定した。固定した血小板は 70-100%のエタノールで段階的に脱水を行い、EPON (TAAB Laboratories Equipment Ltd., Berkshire, UK) に包埋した。検体は薄切した後、酸化ウラニルとクエン酸鉛で染色し、走査電子顕微鏡 JEM1200EX (Japan Electron Optics Co. Ltd., Tokyo, Japan) で加速電圧 80kV の条件で観察した。

2-6 フローサイトメーターを利用した血小板活性化

Paxillin ノックダウン (Pxn-KD) 血小板の活性化をフローサイトメーターで確認した。マウスインテグリン α IIb β 3 の活性化を認識する単クローン抗体である JON/A (Emfret Analytics GmbH & Co., Eibelstat, Germany) と α 顆粒放出反応を示す P-selectin に対する単クローン抗体 (BD Biosciences Co., San Jose, CA) を用いた。

1 x 10⁷/ml に調整したマウス洗浄血小板を作製し、CaCl₂を最終濃度で 1 mM

となるように添加した。血小板刺激アゴニストと同時に, phycoerythrin (PE) -標識 JON/A とビオチン標識抗 P-selectin 抗体を加えた後, allophycocyanin (APC) 標識ストレプトアビジンと反応させた。抗体との結合はフローサイトメーター (FACSAria Cell Sorter; Becton Dickinson, Mountain View, CA) で直ちに確認した。

2-7 血小板凝集能

洗浄血小板を 1 mM の CaCl_2 と 200 $\mu\text{g/ml}$ のヒトフィブリノゲンを添加した Hepes/Tyrode バッファーで $2 \times 10^8/\text{ml}$ に調整した。アゴニスト添加後の光の透過性変化を血小板凝集計 PA-200 (Kowa Co. Ltd., Tokyo, Japan) を用いて測定した。透過度は刺激前の透過度を 0%, バッファーのみの透過度を 100%と設定した。

2-8 血小板放出物質定量

洗浄血小板を 1 mM の CaCl_2 と 200 $\mu\text{g/ml}$ のヒトフィブリノゲンを添加した Hepes/Tyrode バッファーで $2 \times 10^8/\text{ml}$ に調整した。アゴニスト刺激 15 分後に血小板上清と血小板を遠心で分離した。血小板は 1% Triton X-100 を含む溶液で溶解した。上清, および血小板中の血小板第 4 因子 (PF4) とセロトニンを ELISA 法により [Mouse CXCL4/PF4 Quantikine ELISA Kit (R & D Systems, Inc., Minneapolis, MN) ; Serotonin ELISA Kit (GenWay Biotech, Inc., San Diego, CA)], トロンボキサン B_2 (TXB_2) を EIA 法 [Thromboxane B_2 EIA Kit (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI)]により測定した。

2-9 血小板粘着

8 well Lab-Tek Chamber Slide (Thermo scientific co., Waltham, MA) を 1% ウシ

血清アルブミン，または 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ フィブリノゲンで 37°C 2 時間固相化した．未刺激，またはコンバルキシン 50 ng/ml で刺激した洗浄血小板 250 μl ($2 \times 10^5/\text{ml}$) を 37°C で 30 分間接着させた．非接着細胞を PBS による洗浄で除去し，3%パラホルムアルデヒドで 1 時間固定した．0.3% triton X-100 と 5% ロバ血清を加えた PBS で透過性とし，ウサギ抗 GFP 抗体 (Medical & Biological Laboratories Co., Ltd. Nagoya, Japan) 1:200 で 4°C 16 時間反応をさせた後，Alexa488 標識抗ウサギ IgG 抗体，ローダミン標識 ファロイジンを添加した．蛍光は共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000, Olympus, Tokyo, Japan) で観察した．細胞面積は ImageJ (NIH, Bethesda, MD) で定量化した．

2-10 血餅退縮

Hepes/Tyrode バッファーで 2 倍希釈したヒト乏血小板血漿にマウス血小板を $3 \times 10^8/\mu\text{L}$ の濃度で懸濁した．血餅生成は 0.1 U/ml のトロンビン添加で行い，添加後の状態を写真で記録した．血餅退縮は血餅から押し出された液体部分 (血清部分) の面積として ImageJ を用いて定量化した．

2-11 ヒトインテグリン $\alpha\text{IIb}\beta 3$ 発現 CHO 細胞におけるインテグリン活性化

ヒトインテグリン $\alpha\text{IIb}\beta 3$ を発現する CHO 細胞 (CHO- $\alpha\text{IIb}\beta 3$) はヒトインテグリン αIIb とインテグリン $\beta 3$ の cDNA を発現ベクター pcDNA3.1 (Invitrogen) に挿入し，リポフェクタミン 2000 (Invitrogen) を用いて CHO-K1 細胞に co-transfection して作製した⁴⁶．

ディッシュ上にまいた CHO- $\alpha\text{IIb}\beta 3$ にポリブレン 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 存在下でレンチウイルスベクターを MOI : 3 で感染させた．感染 48-72 時間後に細胞を PBS で洗浄し， CaCl_2 を 1.5 mM 加えた Hepes/Tyrode バッファーに浮遊させた．インテグリン $\alpha\text{IIb}\beta 3$ の活性化は GRGDS (Peptide insitiute, Inc., Osaka, Japan) 1 mM の存在下および

非存在下にヒト活性化インテグリン特異的抗体である PAC-1 (Becton, Dickinson and Company Bioscience) を加えて 30 分反応させた後, PE-Cy7 標識抗マウス IgM 抗体 (eBioscience, San Diego, CA) と反応させ, フローサイトメーターで解析した.

2-12 細胞内 Ca²⁺動員

GFP 存在下でも Ca²⁺と反応して蛍光を発するプローブ (GFP-Certified FluoForte dye ; Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, NY) を用いて Ca²⁺濃度を評価した. 洗浄血小板を GFP-Certified FluoForte dye と混和し 37°C 45 分の後, 室温で 15 分放置し, 血小板内にこの蛍光プローブを取り込ませた. 凝集反応や細胞外 Ca²⁺, 放出反応の影響を回避するために 1 mM EDTA と 5 mg/ml apyrase, 10 μM SQ29548 を加えた HEPES/Tyrode バッファーで 2 x 10⁸/ml に調整した. アゴニスト刺激後, 蛍光を励起光 530 nm 放出光 570 nm の条件でマイクロプレートリーダー (Gemini EM, Molecular Devices, LLC., Sunnyvale, CA) で測定した.

2-13 GST 融合蛋白質の作製

活性化型の Rap1b と直接反応する Ral guanine nucleotide dissociation stimulator (Ral-GDS) の Ras-binding domain (RBDs) を RT-PCR でクローニングし, pGEX4T-1 plasmid (GE healthcare, Piscataway, NJ) に挿入した. 作製したプラスミドを保有する大腸菌 (BL-21) から, isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, (IPTG) により目的蛋白質の発現を誘導した. 大腸菌を 1% sodium lauryl sarcosinate, 1%, 及び Triton X-100 により可溶化し, 発現した GST 融合蛋白質を glutathione-sepharose 4B カラムで精製した.

2-14 細胞内 Rap1b 活性化

1 mM の EDTA、5 mg/ml の apyrase、10 μ M の SQ29548 を加えた HEPES/Tyrode バッファー 250 μ l 中に洗浄血小板が 10×10^6 存在するように調整した。血小板はアゴニスト刺激後に Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics Co., Basel, Switzerland) を加えた溶解バッファー (100 mM Tris-HCl pH 7.4, 2% Triton X-100, 200 mM NaCl, 4 mM EDTA) で 4°C, 20 分間反応させ可溶化した。9700 x g で 5 分間の遠心後、非特異的に結合する蛋白質を glutathione-sepharose 4B を加え除去した。上清に 10 μ g の Ral-GDS-GST 融合蛋白質を加え 4°C, 30 分間反応させた後、glutathione-sepharose 4B を加え、さらに 30 分反応させた。Ral-GDS-GST 融合蛋白質に結合した蛋白質を glutathione-sepharose 4B と共に回収し、1 x SDS sample buffer を加え 2 分間 100°C で加熱した。蛋白質を SDS-PAGE により展開し、PVDF 膜に転写後、抗 Rap1b 抗体 (Upstate Cell Signaling Solutions, Lake Placid, NY) を用いた immunoblotting により Ral-GDS-GST 融合蛋白質に結合した活性型 Rap1b を検出した。

2-15 生体内血栓イメージング

マウス生体内の血栓形成能を共焦点顕微鏡で評価した。まず、可視化のため Texas Red-dextran, Hoechst 33342, Dylight 488 標識抗 CD42b 抗体を麻酔したマウスに静注し、続けて活性酸素産生のため hematoporphyrin を静注した。その後、腹部に小切開を加え、腸間膜血管をフルフレーム高速共焦点顕微鏡 (Nikon A1R ; Nikon, Tokyo, Japan) で観察した。レーザー照射により活性酸素を発生させた血管内で形成された血栓は面積を計測し、血管内に占める割合で評価した。血管内皮障害を伴うモデルはマウス大腿動脈血管壁に 10% FeCl₃ をしみこませたろ紙を接触させることで血栓形成を

開始させ高速多光子共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon A1R MP) で観察した。血栓形成は血管内に占める血栓の面積で評価した。

2-16 出血時間

マウスの尾の末端から 5 mm の部分を麻酔下に切断し、速やかに 37°C に加温した PBS に浸けた。目視観察で出血が止まるまでの時間を出血時間として計測した。

2-17 統計処理

データの有意差検定は全て t 検定を用いて行い、 $P < 0.05$ を有意とした。

第3節 結果

3-1 Paxillin 発現抑制 (Pxn-KD) 血小板の作製

レンチウイルスベクターを MOI : 5 で感染させた骨髄細胞をレシピエントマウスに移植し, 約 1 ヶ月後に採血を行い, 末梢血血液細胞の GFP 陽性率を確認した. GPIb α プロモーターでの GFP 発現により血小板特異的な GFP ラベルに成功した (図 11). GFP 陽性血小板の数はコントロールと同等であった (図 11). immunoblotting 法により, この shRNA 発現による無核の血小板における Paxillin 発現の特異的な抑制を確認した (図 12). 一方, 同抗体で同時に認識される Paxillin family member である Hic-5 と Leupaxin の発現は影響を受けなかった (図 12).

電子顕微鏡により, 得られた Paxillin 発現抑制 (Pxn-KD) 血小板の構造を検討した. Pxn-KD 血小板ではコントロールと比較して, 血小板サイズが増大していた (図 13, 図 14). Image J により細胞質部分と顆粒部分の面積を個別に定量すると, 血小板サイズの変化は主として細胞質の増加であり, 顆粒の大きさには有意な変化を認めなかった (図 15A). 血小板に含まれる顆粒内容物量にも変化を認めなかった (図 15B, C). 表面に発現する膜糖蛋白質の発現では, GPIIb/IIIa (インテグリン α IIb β 3) と GPIb の発現は Pxn-KD 血小板で僅かに増加し, コラーゲン受容体 GPVI には影響しなかった (図 16).

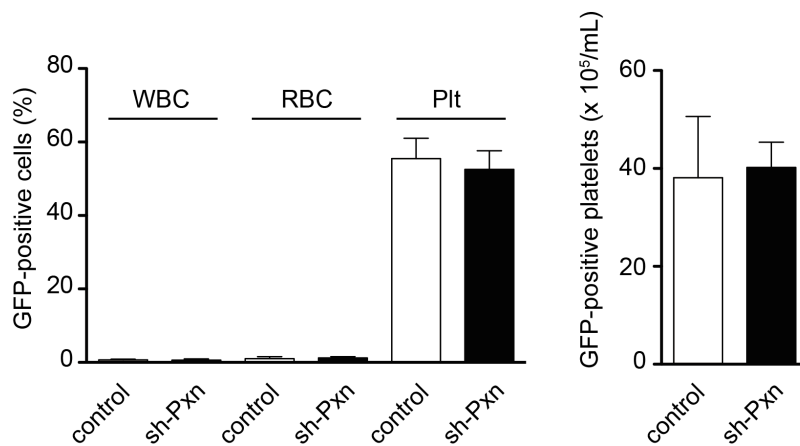


図 11. 骨髄細胞移植後の各血球細胞における GFP 陽性率と血小板数.

マウス骨髄細胞に MOI:5 でコントロール配列, または Paxillin に対する shRNA 配列をもつレンチウイルスベクターを感染させた. 感染細胞を放射線照射したレシピエントマウスに移植した. A) 1 ヶ月後の各血球細胞の GFP 陽性率. GPIb α プロモーターを用いることで血小板特異的な GFP 発現を可能とした. B) GFP 陽性血小板の数. コントロール, Pxn-KD 間で差を認めなかった.

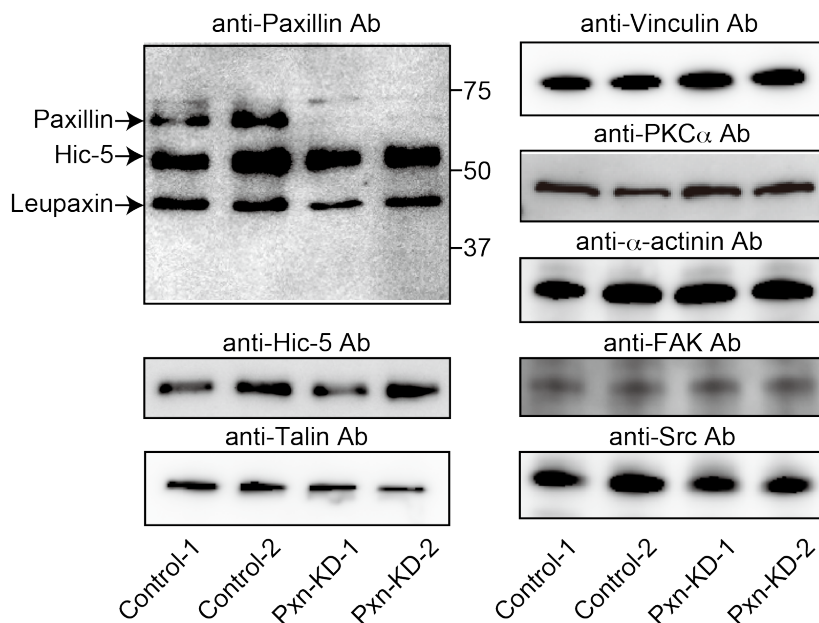


図 12. 血小板内蛋白質発現

GFP 陽性率が 70%以上のコントロール, Pxn-KD マウスそれぞれ 2 匹ずつから採血を行い, 洗浄血小板を可溶化後に, 各特異抗体を用いて細胞内蛋白質の immunoblotting を行った.

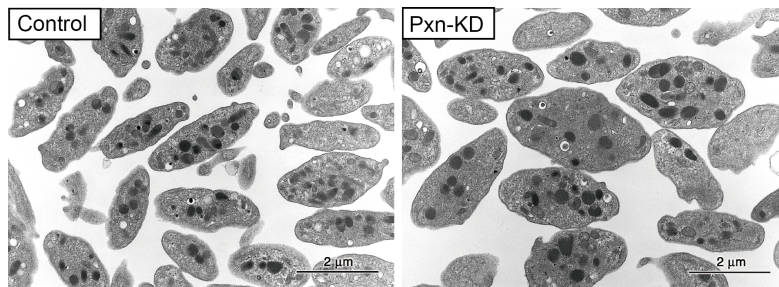


図 13. Pxn-KD 血小板の電子顕微鏡での観察

電子顕微鏡でコントロールと Pxn-KD の血小板を観察した。内部構造には観察範囲で変化を認めなかったが、血小板サイズが増加していた。

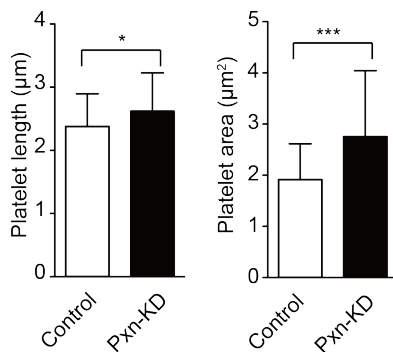


図 14. 血小板サイズの測定

電子顕微鏡で得られた血小板像から血小板の長軸の長さ (length), および面積 (area) を ImageJ を用いて定量化した (n=53-72) (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$).

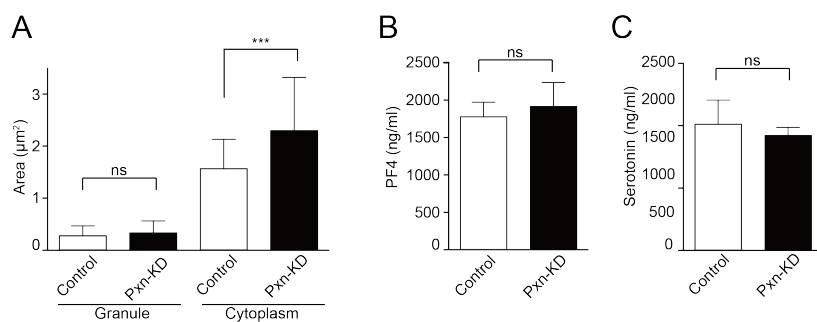


図 15 血小板細胞質と顆粒内の面積，及び顆粒内容物量

A) 血小板細胞質と顆粒内面積. コントロールならびに Pxn-KD 血小板の電子顕微鏡像から Image J を用いて細胞質と顆粒部分の面積を個別に定量化した ($n=53-70$).
 B) C) 血小板顆粒内容物の定量. 未刺激の血小板中の放出物質の濃度 (B: PF4; C: セロトニン) を ELISA 法で測定した. (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

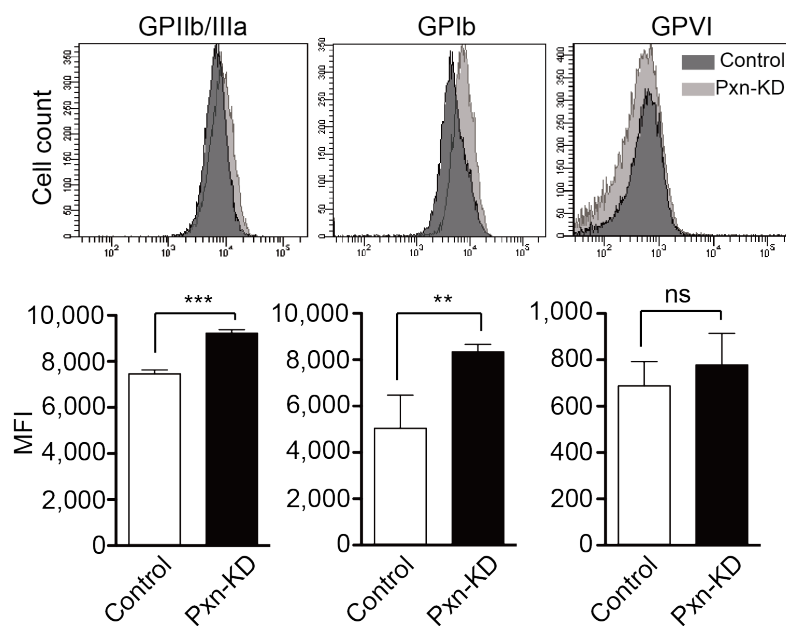


図 16. Pxn-KD 上の膜糖蛋白質の変化

コントロールと Pxn-KD 血小板の膜糖蛋白質をフローサイトメーターで定量化した. GPIIb/IIIa, GPIb は Pxn-KD で僅かに増加が認められたが, GPVI には変化を認めなかった (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

3-2 Pxn-KD は血小板インテグリン活性化を亢進させる

まず, Paxillin のインテグリン活性化, 凝集反応における役割について検討した. shRNA 発現が認められる GFP 陽性血小板が明確に区別できるように, フローサイトメーターを用いた. マウス活性化インテグリン特異的抗体である JON/A を用いアゴニストに対するインテグリン活性化を検討した. GPVI アゴニストであるコンバルキシン及びトロンビン受容体 PAR-4 アゴニストペプチド (PAR4) によるインテグリン α IIb β 3 の活性化は Pxn-KD 血小板での GFP 陽性領域において亢進していた (図 17A). この現象は他のアゴニストである ADP, U46619 でも同様であった (図 17). 一方, 未刺激およびエピネフリン刺激血小板のインテグリン活性化状態には差を認めず, Paxillin 発現抑制は直接インテグリン活性化を引き起こさないこと, ならびに Gi 依存性の経路を修飾しないことが示唆された (図 17). 次に GFP 陽性率が 70%以上の血小板を用い, 透過度法による血小板凝集能を測定した. フローサイトメーターを用いた検討と同様に Pxn-KD 血小板は透過度法による血小板凝集能が亢進しており, より低濃度のアゴニスト刺激で強い凝集が起こることが確認された (図 18).

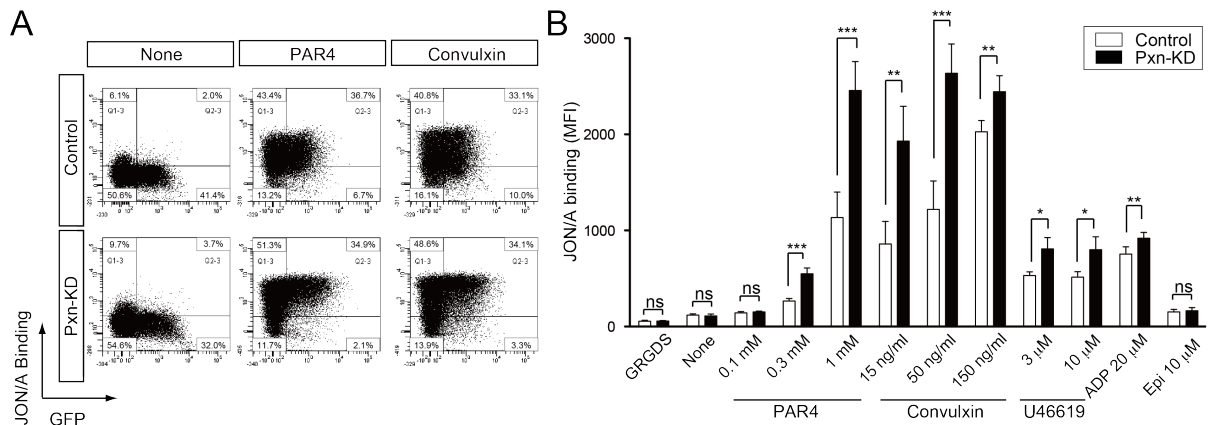


図 17 アゴニスト刺激によるインテグリン活性化

骨髓移植によりコントロール，ならびに Pxn-KD 血小板保有マウスを作成した．アゴニスト刺激後の JON/A 結合をフローサイトメーターにより評価した．A) 縦軸にインテグリンの活性化，横軸に GFP をとった．Pxn-KD 血小板では GFP 陽性の領域で，アゴニスト刺激によるインテグリン活性化が亢進した．B) 種々のアゴニスト刺激に対するインテグリンの活性化を定量化した．(* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$)

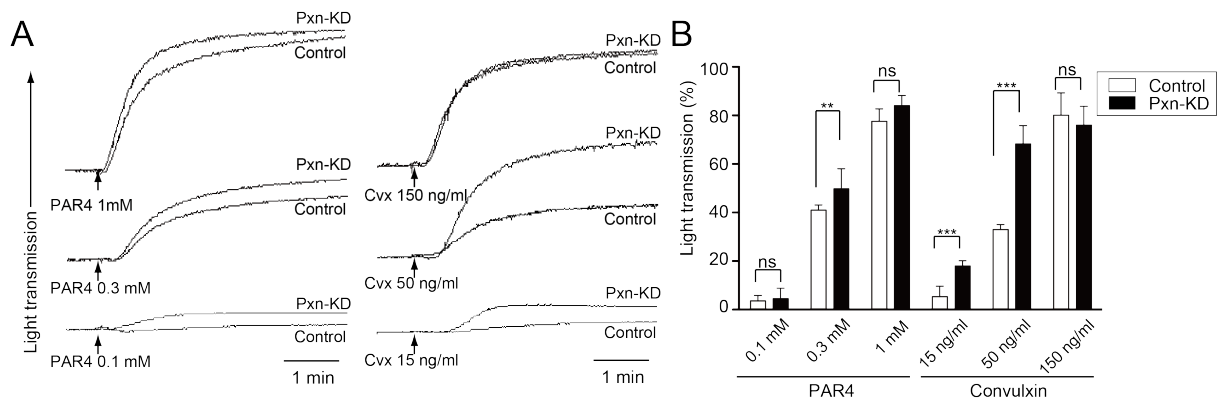


図 18 透過度法による血小板凝集能評価

骨髓移植によりコントロール，ならびに Pxn-KD 血小板保有マウスを作成した．洗浄血小板を作成し，アゴニスト刺激後の血小板凝集能を透過度法により測定した．A) 透過度法による血小板凝集能測定の代表例．矢印に示す時点で PAR4 アゴニストペプチド，またはコンバルキシン (Cvx) を添加した．B) PAR4，コンバルキシン各濃度における凝集能を定量化した．透過度は未刺激の血小板浮遊状態を 0%，buffer のみの透過度を 100%として計測した．(* $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$)

3-3 Pxn-KD は血小板放出反応とトロンボキサン合成を亢進させる

次に、血小板活性化における放出を評価するために、 α 顆粒放出の指標として細胞表面上の P-selectin 発現を検討した。JON/A の結合と同様に、コントロール血小板と比較して、種々のアゴニスト刺激による P-selectin 発現が Pxn-KD 血小板で有意に上昇していた (図 19)。次に、実際に活性化血小板より放出される物質を ELISA, または EIA 法により測定した。 α 顆粒内容として PF4 (図 20A), 濃染顆粒内容としてセロトニン (図 20B), そして合成されたトロンボキサンを測定した (図 20C)。いずれの測定においても、コントロール血小板と比較して Pxn-KD 血小板では、細胞上清中の放出物質が増加していた。特にトロンボキサン合成・放出能は顕著に亢進していた。

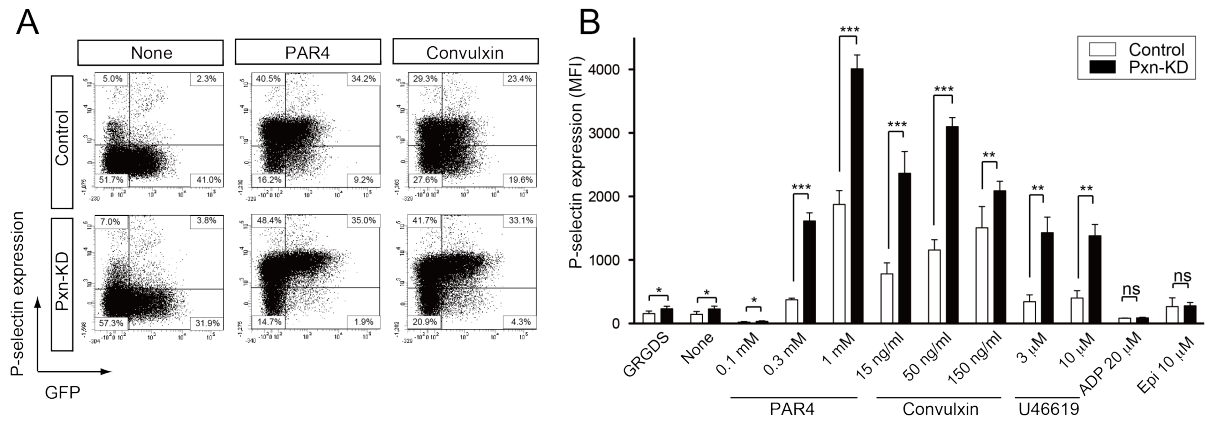


図 19 アゴニスト刺激による血小板表面上の P-selectin 発現

骨髓移植によりコントロール，ならびに Pxn-KD 血小板保有マウスを作成した。アゴニスト刺激後の P-selectin の発現をフローサイトメーターにより評価した。A) 縦軸に P-selectin の発現，横軸に GFP をとった。Pxn-KD 血小板では GFP 陽性の領域で，アゴニスト刺激による P-selectin の発現が亢進した。B) 種々のアゴニスト刺激に対する P-selectin の発現を定量化した。(* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$)

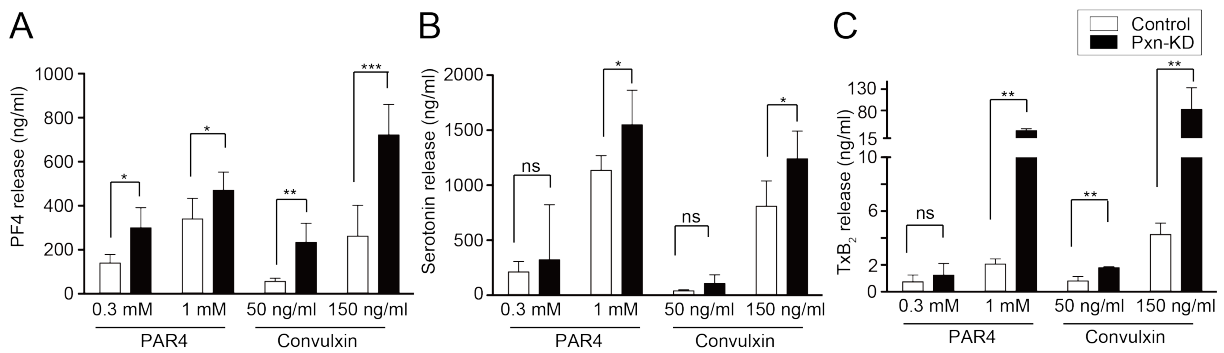


図 20 活性化血小板上清中の血小板放出物質の定量

骨髓移植によりコントロール，ならびに Pxn-KD 血小板保有マウスを作成した。アゴニスト刺激後の血小板上清中の放出物質の濃度 (A : PF4 ; B : セロトニン ; C : TXB₂) を ELISA, または EIA により測定した。(* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$)

3-4 Pxn-KD の表現型は一部を放出反応に依存する

放出反応の亢進を認めたことから血小板活性化が放出反応を介した二次的なものである可能性を考慮し、ADP スカベンジャーの apyrase とトロンボキサン受容体アンタゴニストの SQ29548 で血小板を前処置し、アゴニスト刺激後のインテグリン活性化と P-selectin の発現を検討した。apyrase, SQ29548 処置により、Pxn-KD 血小板の活性化亢進は一部減弱したものの、その血小板活性化亢進状態は残存した (図 21)。以上より、Pxn-KD 血小板における血小板活性化亢進は、一部は放出反応の亢進に依存するものの、放出能の亢進のみでは説明できないと考えられた。

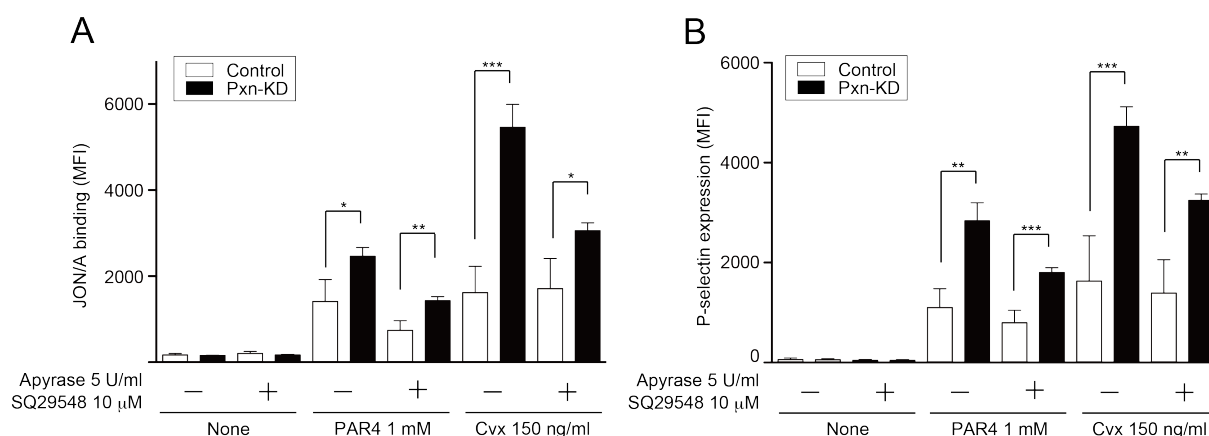


図 21 Pxn-KD 血小板の表現形に対する放出反応の影響

骨髓移植によりコントロール, ならびに Pxn-KD 血小板保有マウスを作成した. 洗浄血小板を作成後, 5 mg/ml apyrase, 10 μM SQ29548 存在下で, PAR4, 及びコンバルキシン刺激後の JON/A の結合能 (A), P-selectin の発現 (B) をフローサイトメーターにより評価した. (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

3-5 Pxn-KD はインテグリン outside-in signaling を亢進させる

インテグリン活性化亢進, 血小板放出反応亢進, トロンボキサン合成亢進から血小板の inside-out signaling が Pxn-KD 血小板では亢進していることが示唆された. 次に, インテグリン outside-in signaling への影響を検討するために, 血小板インテグリンのリガンドであるフィブリノゲン結合後の伸展反応を共焦点レーザー顕微鏡で検討した. 伸展反応を細胞面積の増加でとらえるとともに, 未刺激状態での血小板サイズ差が結果に影響を与えないよう伸展反応はフィブリノゲン上で伸展した血小板面積から BSA に付着させた際の血小板面積を減じた値で定量化した. 図 22 に示すように, フィブリノゲン上の伸展反応は Pxn-KD 血小板で有意に増加しており, さらにコンバルキシンによる刺激を加えるとその差は顕著となった. 血栓形成後の血餅退縮にも, 血小板の存在, ならびに血小板膜表面の GPIIb/IIIa の outside-in signaling が必須である. そこで, 血餅退縮における Paxillin の outside-in signaling への影響を明らかとするために, トロンビン添加後の血餅退縮能を評価した. トロンビン添加後の血餅が縮小し, 生じた血清量を経時的に測定すると, Pxn-KD 血小板ではコントロール血小板と比して血餅退縮能も亢進していた (図 23) .

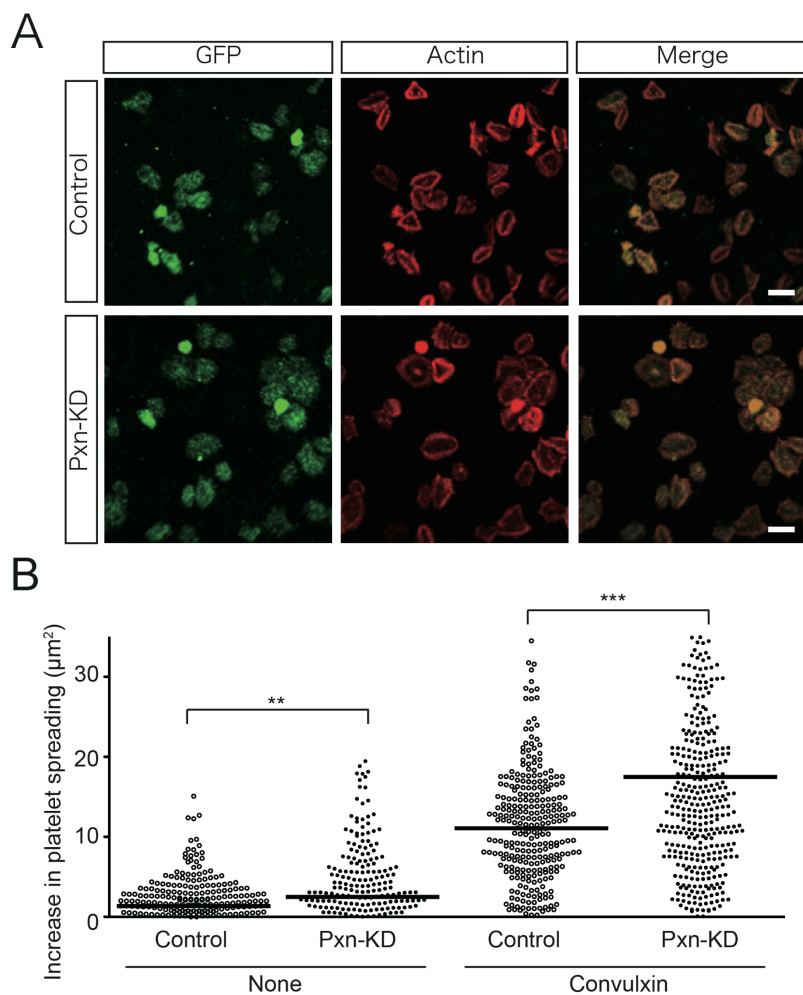


図 22 フィブリノゲン上における血小板進展能

骨髓移植によりコントロール，ならびに Pxn-KD 血小板保有マウスを作成した．洗浄血小板をコンバルキシン (50 ng/ml) 刺激後にフィブリノゲンへ 30 分間接着・伸展させた．A) 付着細胞を共焦点レーザー顕微鏡にて画像化した．B) 未刺激，ならびにコンバルキシン刺激血小板進展後の細胞面積をフィブリノゲン上に接着した血小板面積から BSA 上の血小板面積を減じて定量化した．(n=281-394) (** P <0.01, *** P <0.001)

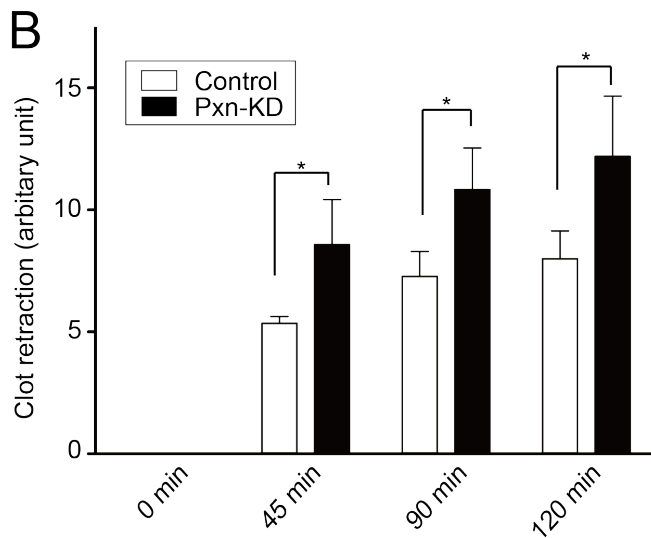
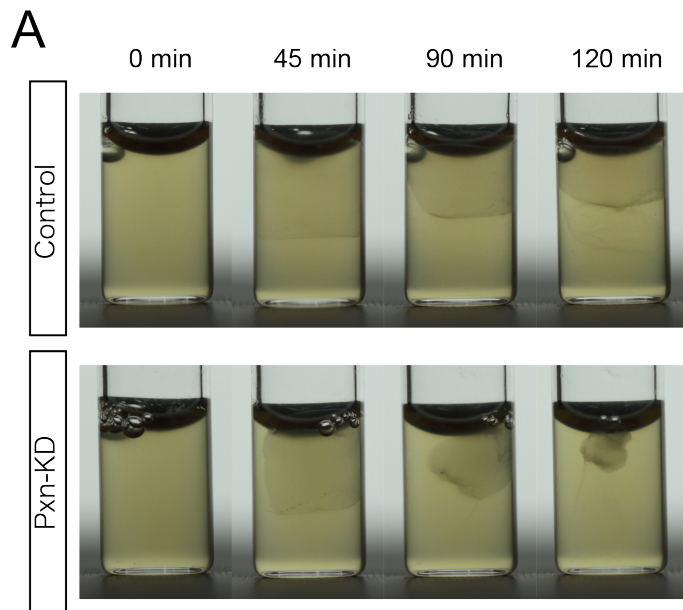


図 23 血餅退縮能

骨髓移植によりコントロール，ならびに Pxn-KD 血小板保有マウスを作成した．洗浄血小板をヒト乏血小板血漿に浮遊させトロンビン(0.1 U/ml)で血液凝固を惹起した．

A) 刺激後定時に写真撮影を行った，B) 血小板退縮は写真上の血清成分（血餅から押し出された液体成分）を面積で測定することで定量化した．(n=3) (* $P < 0.05$)

3-6 Pxn-KD は Talin 依存性のインテグリン活性化に影響しない

Pxn-KD が直接インテグリン活性化を惹起するか、または Talin 依存性のインテグリン活性化に影響を与えるかを検討した。ヒトインテグリン α IIb β 3 を発現する CHO- α IIb β 3 細胞に Paxillin の shRNA 配列を発現させるレンチウイルスベクターと shRNA 配列と同時に、インテグリン α IIb β 3 を直接活性化しうる Talin FERM ドメインと GFP の融合蛋白を発現させるレンチウイルスベクターを感染させた (図 24A)。目的蛋白質の発現と発現抑制は immunoblotting で確認した (図 24B)。次に、活性化インテグリン α IIb β 3 を認識する単クローン抗体 PAC-1 を用いてインテグリン活性化を定量化した。Pxn-KD 単独では CHO- α IIb β 3 細胞のインテグリン構造変化を起こすことはなく、また、Talin FERM ドメイン発現によるインテグリン α IIb β 3 の活性化にも影響を及ぼさなかった (図 24C, D)。以上より、Pxn-KD が直接インテグリン α IIb β 3 の構造変化を引き起こすことで血小板活性化を亢進する機序は否定的である。

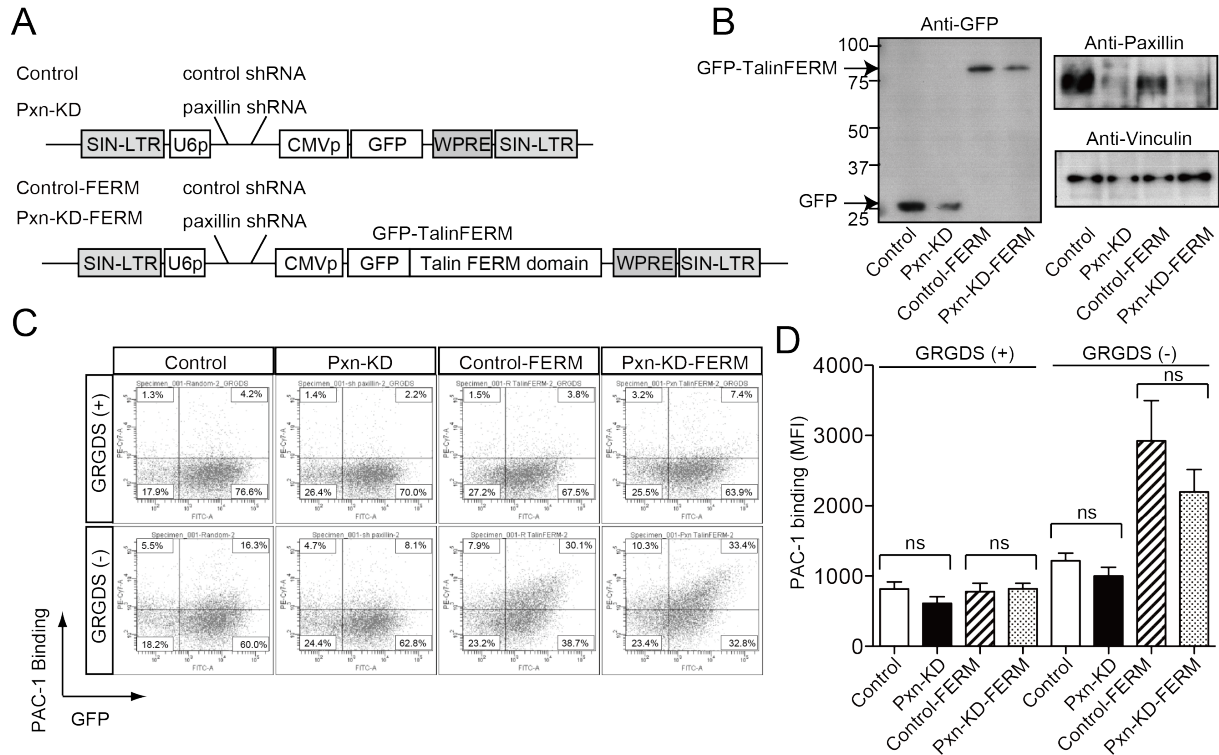


図 24 CH0- α IIb β 3 上の Talin 依存性インテグリン活性化に与える影響

CH0- α IIb β 3 細胞にレンチウイルスベクターを感染させ、インテグリン活性化を単クローン抗体 PAC-1 により検出した。A) U6 プロモーターで shRNA 配列と同時に CMV プロモーターで Talin FERM ドメインと GFP の融合蛋白質を発現させるレンチウイルスベクターを作製した。B) レンチウイルスベクターを感染させ、抗 GFP 抗体と抗 Paxillin 抗体、並びに Vinculin 抗体でその発現を確認した。C) GRGDS ペプチド非存在下、存在下でのインテグリンの活性化をフローサイトメーターにより評価した。横軸：GFP；縦軸：インテグリン活性化。D) インテグリン活性化の定量評価 (n=4)。

3-7 Pxn-KD は GPVI 刺激後のチロシンリン酸化反応に影響を与えない

GPVI からのシグナル伝達は非受容体型チロシンリン酸化酵素の活性化を引き起こす。Pxn-KD が初期の血小板活性化シグナルに関与するか否かを明らかにするために、GPVI アゴニストであるコンバルキシンで刺激後の、血小板内蛋白質のチロシンリン酸化を immunoblotting の手法で検討した。コンバルキシン刺激による血小板内チロシンリン酸化はコントロールと Pxn-KD 血小板で差異を認めなかった (図 25)。

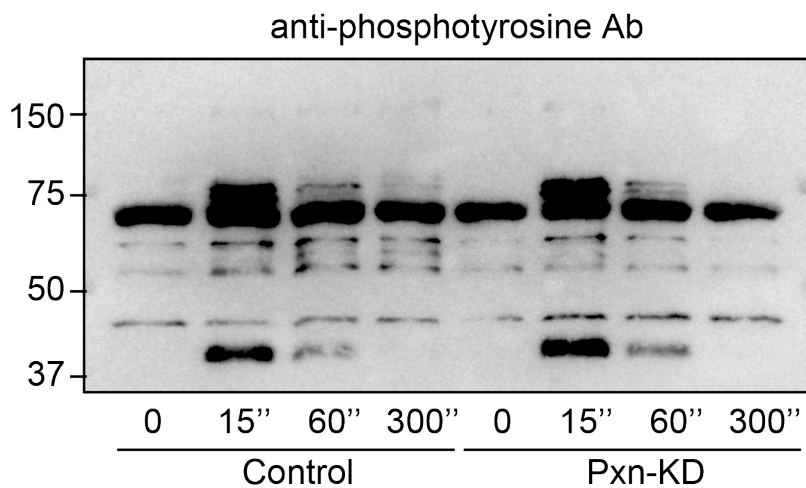


図 25. GPVI 刺激による血小板内チロシンリン酸化反応

骨髓移植によりコントロール, ならびに Pxn-KD 血小板保有マウスを作成した。洗浄血小板をコンバルキシン (150 ng/ml) で刺激した後に可溶化し, 蛋白質を SDS 電気泳動にて分離後, リン酸化チロシン化反応を単クローン抗体 4G10 を用いて immunoblotting により検出した。

3-8 Pxn-KD は細胞内 Ca^{2+} 動員を増加させない

GPVI, ならびに 7 回膜貫通型受容体を介した血小板活性化反応において, ホスホイノシチド (PI) ターンオーバーに付随する細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は血小板活性化シグナル伝達初期に起こる共通した活性化経路である. Pxn-KD により影響を受ける作用点を明らかにするため, アゴニスト刺激後の血小板内 Ca^{2+} 濃度を測定した. アゴニスト刺激後の血小板内 Ca^{2+} 濃度は Pxn-KD で増加することは無く, 寧ろ減少した (図 26). このことから少なくとも Pxn-KD 血小板における活性化亢進が PI ターンオーバーの増強からもたらされるものでは無いと推測される.

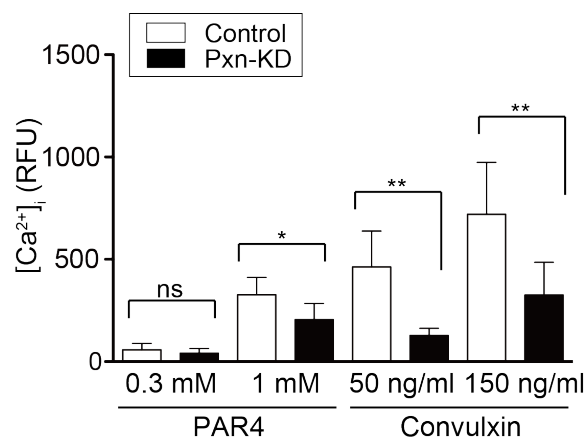


図 26 アゴニスト刺激による細胞内 Ca^{2+} 動員

骨髓移植によりコントロール, ならびに Pxn-KD 血小板保有マウスを作成した. Ca^{2+} 依存性の蛍光プローブを洗浄血小板に取り込ませ, PAR4 アゴニストペプチドまたはコンバルキシンで刺激し, 最大蛍光強度を定量化した. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

3-9 Pxn-KD は細胞内 Ca²⁺非依存的血小板活性化経路にも影響する

細胞内 Ca²⁺濃度が減少するにも関わらず, Pxn-KD により血小板活性化が高まることから, 細胞内 Ca²⁺非依存性経路の重要性について検討した. EDTA と BAPTA-AM を用い, 細胞外と細胞内の Ca²⁺をキレートした条件で血小板にアゴニスト刺激を行った. JON-A 抗体は Ca²⁺がキレートされた条件では結合が認められないために, P-selectin の発現を血小板活性化指標として用いた. EDTA と BAPTA-AM による前処置でコントロール血小板はアゴニスト刺激時も殆ど活性化が起こらなかったが, Pxn-KD 血小板は程度こそ減弱するものの, コントロール血小板と比較して強い活性化を認めた (図 27). このことから Pxn-KD は Ca²⁺非依存的な血小板活性化も増強させていると考えられる. 一方, BAPTA-AM 前処置により Pxn-KD 血小板活性化が減弱することから Ca²⁺依存的な刺激の増幅にも関与している可能性がある.

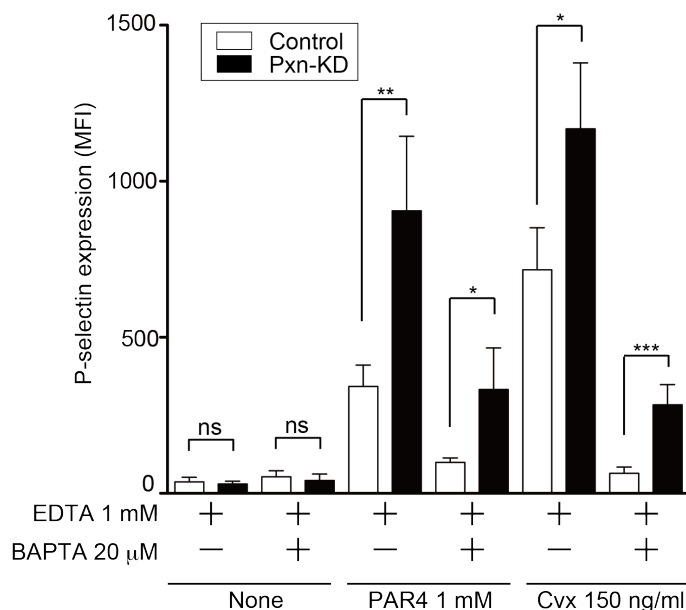


図 27 Ca²⁺キレート下での P-selectin 発現

骨髓移植によりコントロール, ならびに Pxn-KD 血小板保有マウスを作成した. 細胞内および細胞外 Ca²⁺を EDTA, BAPTA-AM を用いてキレートした条件下で, PAR4 アゴニストまたはコンバルキシン刺激後の P-selectin の発現をフローサイトメーターにより定量化した. (**P*0.05, ***P*0.01, ****P*0.001)

3-10 Pxn-KD は Rap1b の活性化を亢進させる

血小板活性化亢進をもたらす Pxn-KD の作用点として、次に Rap1b に着目した。Rap1b は血小板活性化シグナルで細胞内 Ca^{2+} 動員より遠位に存在し、インテグリン活性化の他、放出反応やトロンボキサン合成にも関与している。血小板刺激後の Rap1b 活性化を pull-down 法を用いて検討した。Pxn-KD 血小板では未刺激の状態から Rap1b が亢進しており、アゴニスト刺激により更に亢進した (図 28)。Pxn-KD による血小板活性化機序として、間接的ではあるが Rap1b の亢進が一機序と推察された。

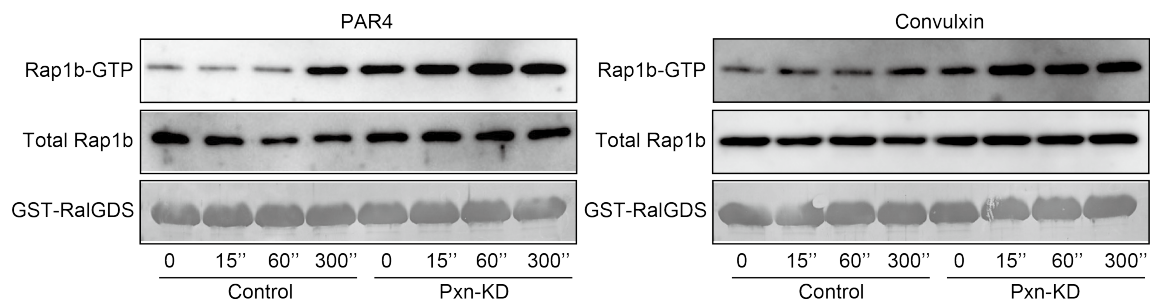


図 28. 血小板内 Rap1b の活性化

骨髓移植によりコントロール、ならびに Pxn-KD 血小板保有マウスを作成した。洗浄血小板を PAR4, コンバルキシンによる刺激後に可溶化した。Ral-GDS の GST 融合蛋白質と共沈する蛋白質を電気泳動した後に抗 Rap1b 抗体による immunoblotting を行った (上段)。可溶化後の全体の Rap1b 量 (中段)。添加した GST 融合蛋白質の蛋白染色 (下段)。

3-11 マウス生体内における血栓形成に与える影響

最後に, Pxn-KD による血小板活性化亢進が生体内での血栓形成に影響を与えるかを検討した. 腸間膜血管においてレーザー照射により活性酸素を産生させ血栓形成を惹起したところ Pxn-KD では血栓形成能が亢進していた (図 29). この現象は大腿動脈における塩化鉄誘発血管障害でも同様であった (図 30). テールカット後の出血時間は Pxn-KD で有意な短縮を認めた (図 31).

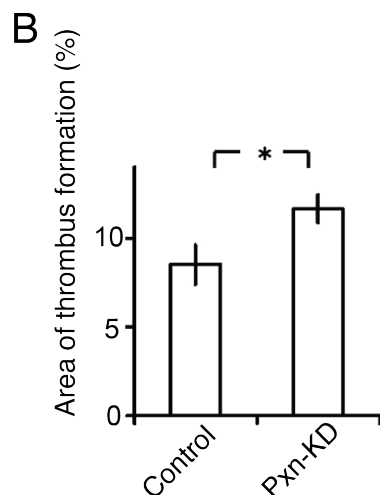
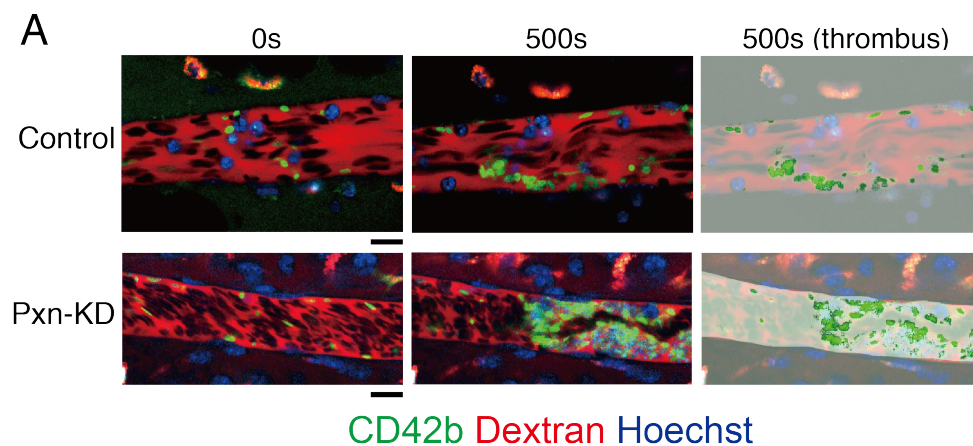


図 29 生体内での血栓形成能の評価

骨髄移植によりコントロール, ならびに Pxn-KD 血小板保有マウスを作成した. GFP 陽性率が 70%以上のマウスを用い, 腸間膜血管にレーザー照射を行い血栓形成を惹起した. A) レーザー照射前 (左) と照射後 500 秒 (中央) の共焦点顕微鏡画像. 血小板血栓形成部位のみ定量化のため抽出した (右). 緑: 抗 CD42b 抗体 (血小板); 赤: Texas-Red デキストラン (血液); 青: Hoechst 33342 (有核細胞). B) 500 秒後の共焦点顕微鏡画像で血栓が血管内に占める面積の割合を定量化した. (* $P < 0.05$)

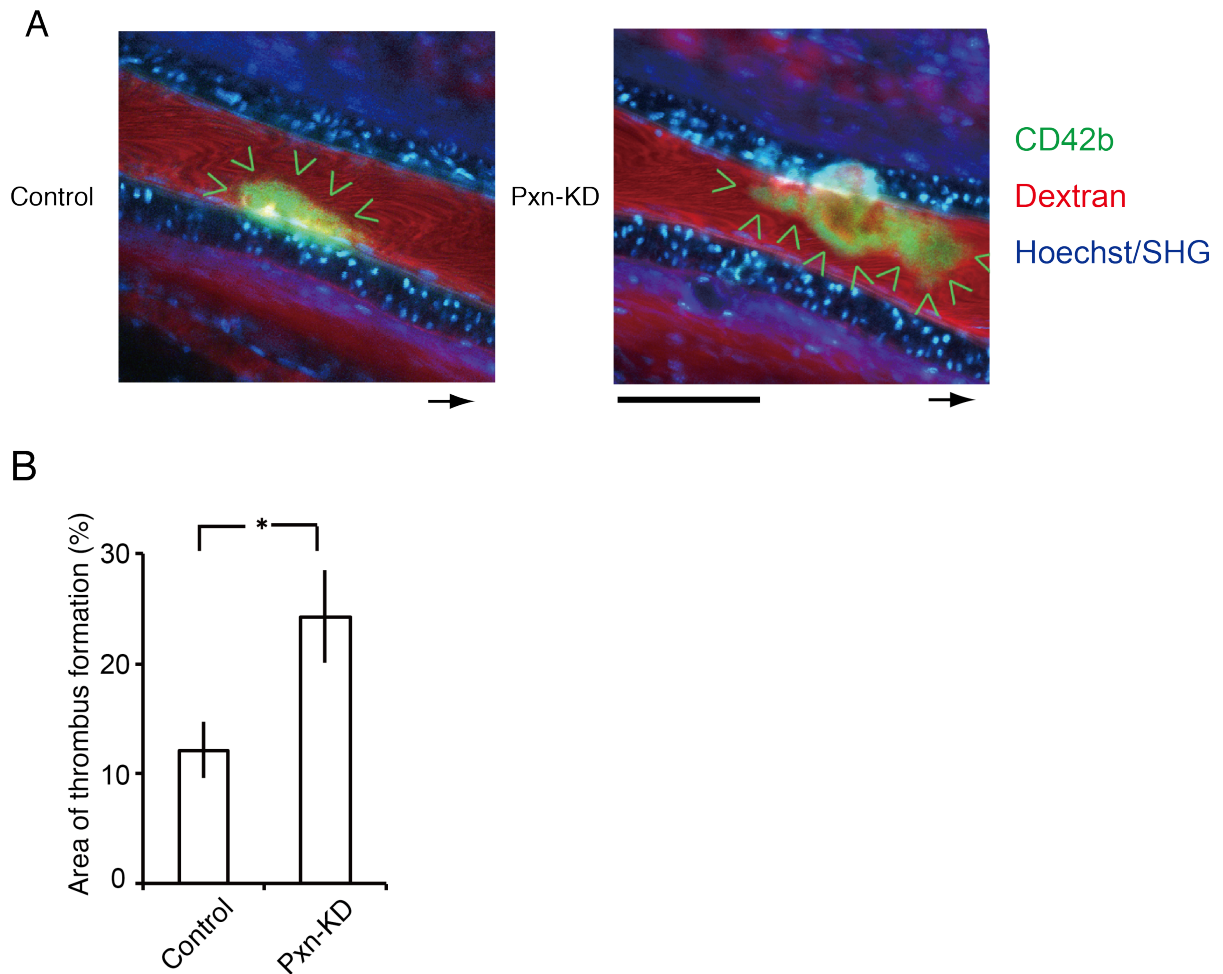


図 30 マウス大腿動脈血管内皮障害による血栓形成

骨髄移植によりコントロール，ならびに Pxn-KD 血小板保有マウスを作成した．GFP 陽性率が 70%以上のマウスを用い，大腿動脈を塩化鉄により傷害し血栓形成を惹起した．A) 塩化鉄暴露後の共焦点顕微鏡画像．緑：抗 CD42b 抗体（血小板）；赤：Texas-Red デキストラン（血液）；青：Hoechst 33342+二次高調波発生（有核細胞+コラーゲン）．B) 共焦点顕微鏡画像で血栓が血管内に占める面積の割合を定量化した．(* $P < 0.05$)

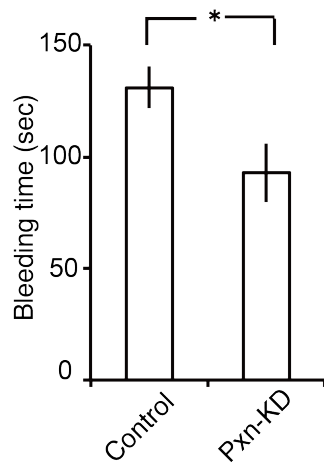


図 31. マウス出血時間

骨髄移植によりコントロール，ならびに Pxn-KD 血小板保有マウスを作成した．GFP 陽性率が 70%以上のマウスを用いテールカット後の止血までの時間を計測した．

(* $P < 0.05$)

第4節 考察

本研究では Pxn-KD 血小板において、血小板凝集反応、粘着反応、ならびに放出反応の増強を認めた。この血小板活性化亢進は実際の生体内における血栓形成にも影響を及ぼしており、マウス生体内では血栓形成能が亢進していた。これら知見から、Paxillin がマウス生体内での一次止血能に対して機能を有することが示唆された。Paxillin の過去の報告に、インテグリンシグナルを正に制御するという報告は散見されるが、細胞活性化シグナルを広範に抑制的に制御するという報告はなく、本研究にみられた血小板活性化における Paxillin の役割は興味深いものであった。

冒頭で述べた様に、血管内の血液流動性を保つため、生体内には血小板活性化を抑制的に制御する機構が存在する。ひとつは外因系制御、もう一つは内因系制御である。前者は、外部環境から供給される血小板活性化抑制物質であり、代表的なものに内皮細胞から放出されるプロスタサイクリンや一酸化窒素(NO)がある。これらの物質は血小板に作用し、細胞内 cAMP や cGMP を上昇させることで、強力に血小板活性化を抑制的に制御している。後者は、血小板自身が持つ細胞内シグナルを抑制的に制御する蛋白質である。血小板膜蛋白質の carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule-1 (CEACAM-1) と platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) が知られている^{47, 48}。CEACAM-1, PECAM-1 ノックアウトマウスの血小板はコラーゲンなどによるチロシンキナーゼ型受容体を介する血小板活性化反応が亢進する。これらの膜蛋白質は immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM)をもち、この部位が GPVI から Fc γ 受容体の immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)のシグナル伝達を抑制する⁴⁸。G 蛋白質を介する血小板活性化シグナルでは、regulator of G-protein signaling (RGS)の Gi α サブユニットへの結合が Rap1b 活性化と独立して血小板活性化を抑制すると報告されている⁴⁹。これらの蛋白質による血

血小板活性化抑制は、それぞれチロシンキナーゼ型受容体、G 蛋白共役受容体を介する活性化シグナルを制御するものであるが、Pxn-KD による血小板活性化シグナルの増強はその両者を介する刺激ともに認められ、Paxillin による血小板活性化修飾は異なる 2 つの受容体からの共通のシグナル伝達経路を制御していると考えられる。このように広範に血小板活性化を抑制的に制御する蛋白質の報告はなく、本研究結果は、血小板シグナル伝達機構に、新たな知見を加えたと思われる。過去にマウス血小板で凝集反応により Paxillin がリン酸化され、このリン酸化部位に Csk が結合することで、outside-in シグナルを抑制的に制御する可能性を示唆した報告があるが³¹、この報告は Paxillin の血小板機能における役割を直接証明したのではなく、また、本研究で得られた広範な Paxillin の機能を説明することもできない。

過去の Paxillin 細胞機能の報告は、インテグリンに関するものが多い。インテグリンを介した Paxillin の機能は、インテグリンがリガンドと結合した後に生じる細胞内シグナル、いわゆる outside-in シグナルにおけるものである。例えば、Paxillin を欠損した繊維芽細胞では細胞接着後のチロシンリン酸化障害と細胞移動障害が起こることが報告されている⁴⁰。インテグリン α IIb β 3 の細胞内ドメインを Paxillin の直接結合が可能な α 4 β 1 ないし α 9 β 1 に変異させると、 α IIb β 3 を介した細胞接着には影響が認められないが、細胞伸展は抑制されるという報告がある^{37 38}。白血球では α 4 インテグリンと Paxillin の結合を阻害すると炎症部位への遊走が阻害される³⁹。これら Paxillin の outside-in シグナルにおける重要な細胞機能には Paxillin の LD3 から LD5 近傍の (Ala¹⁷⁶-Asp²⁷⁵) と α 4 インテグリンの細胞質ドメインに存在する 9 個の保存されたアミノ酸領域 (Glu⁹⁸³-Tyr⁹⁹¹) との直接結合が必須とされている⁵⁰。今回の検討では CHO- α IIb β 3 細胞において Pxn-KD は血小板インテグリンの構造変化に直接の影響を与えなかった。さらに過去の知見から血小板の α IIb には

Paxillin が直接結合しないことが知られており、今回の Pxn-KD 血小板の表現型は Paxillin とインテグリンとの結合がもたらした結果ではないと考えられる。

では、Paxillin は血小板活性化にいたる、シグナル伝達経路のどの部位を制御しているのでしょうか？コラーゲン受容体 GPVI を介した上流のチロシンリン酸化は Pxn-KD により影響を受けなかった。GPVI ならびに G 蛋白質共役型受容体に共通する最上流のシグナル伝達はホスホイノシチドターンオーバーの結果による細胞内カルシウムの動員であるが、細胞内カルシウム濃度は Pxn-KD 血小板でコントロールと比較して上昇せず、むしろ低下した。このことから Paxillin による血小板活性化亢進は細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇によるものではなく、それよりも下流シグナルが制御されていることが示唆された。さらに細胞内カルシウムを BAPTA-AM によりキレートすると、コントロール血小板はアゴニスト刺激後の P-selectin の発現が未刺激血小板に近づくが、Pxn-KD 血小板では上昇が認められた。この結果はカルシウム非依存性の血小板活性化経路も Paxillin により修飾されていることを示唆している。

我々は、Paxillin が制御する下流シグナルとして Rap1b に着目した。過去の Rap1b 欠損マウスや、その活性化因子である CalDAG-GEFI 欠損マウスの血小板は、Pxn-KD 血小板と逆の表現型を示す。Rap1b 欠損血小板では血小板凝集と α 顆粒放出が障害されるがカルシウム動員には変動が認められない^{8,9}。CalDAG-GEFI 欠損血小板では複数のアゴニスト刺激に対するインテグリン活性化の障害とトロンボキサン合成の障害が認められることが報告されている¹⁰。今回の検討では、Pxn-KD 血小板の Rap1b 活性化は未刺激時より亢進しており、さらにアゴニスト刺激後の Rap1b 活性化は刺激後早期から亢進していた。この Rap1b 活性化亢進が、直接 Pxn-KD 血小板の表現型に関与しているかどうかは明らかではないが、表現型の比較から Rap1b が Paxillin の標的因子の一つである可能性が考えられる。

Paxillin により制御される細胞内シグナル蛋白質に Rap1b と同様の低分子量 GTPase の Rho family がある。Rho, Rac, Cdc42, 等からなる Rho family GTPase は細胞骨格蛋白質アクチンの制御や細胞運動性の制御, 形態発生制御に関与している⁵¹。Rho の活性化が接着斑形成やストレスファイバーを形成し⁵², Rac の活性化が膜状仮足形成や糸状仮足形成を引き起こす⁵³ Paxillin は細胞やショウジョウバエの実験より Rho の活性化を負に Rac の活性化を正に制御すると報告されている⁴²。Rac 活性化制御は Paxillin と結合部位を持つ ARF-GAPs 及び Crk を介した guanine nucleotide exchange factor (GEF) に対する間接的な反応により行われている。特に ARF-GAP である G-protein coupled receptor kinase interacting protein (GIT) を介して結合した Rac-specific GEF (PIX) と Rac の反応相手である p21-activated serine/threonine kinase (PAK), SH2-SH3 アダプター蛋白質である Nck の複合体による Rac 活性化が知られている^{54 55}。一方, Rho 活性化制御は Rho GAP や GEF の関与が想定されているが, いまだ明らかとされていない。ショウジョウバエにおける Paxillin 強発現の表現型は Rho 下流に存在する LIM kinase 強発現や GEF 欠失により補正されることから, Paxillin 強発現の表現系が発生段階での Rho, Rac の調整障害によるものであることが明らかとされている⁴²。本研究結果で得られた Pxn-KD 血小板における Rap1b の活性化亢進においても Paxillin が GEF 等に影響を及ぼし, Rap1b の活性化を制御している可能性はないだろうか。

Pxn-KD 血小板では細胞サイズの増大という変化も認められた。Bernard-Soulier, Gray platelet, May-Hegglin 等, 血小板サイズの増大を示す疾患はあるものの, それらは血小板機能低下を病態として示すもので Pxn-KD 血小板とは明らかに異なる。最近 PDZ-LIM 蛋白質である CLP36 が血小板活性化に関与しているという報告がなされた⁵⁶。PDZ-LIM 欠損血小板ではサイズが僅かに拡大するとともに

GPVI を介する血小板活性化亢進が認められた。この特徴は G 蛋白質を介する活性化反応に与える影響などに一部相違があるものの、今回の我々の発見と類似する。血小板サイズの規程には LIM ドメイン蛋白質が重要な役割を持っているのかもしれない。

本研究結果をヒトに適応するには、ヒト血小板とマウス血小板の Paxillin family 蛋白質の発現の違いを考慮しなければならない。ヒト血小板には Hic-5 が主に発現しているのに対し、マウス血小板では Paxillin だけでなく、Hic-5 や Leupaxin 等、すべての Paxillin family 蛋白質が発現している³¹。マウス Hic-5 の機能に関しては、我々の得た Pxn-KD 血小板の結果と異なり、Hic-5 ノックアウトマウスで出血時間延長が認められ、血小板ではトロンビンによる凝集能の活性化が僅かに障害される⁵⁷。Leupaxin に関しては、我々の Pxn-KD と得られた結果と同様に B 細胞における受容体シグナルを抑制的に制御するという報告がある⁵⁸。ヒト血小板において Hic-5 がマウス Paxillin の機能を補填する作用があるか、今後は人工多能性幹細胞由来の巨核球などを用いた手法により明らかにする必要性が有るだろう。これらの構造的に類似した蛋白質の発現は各組織により異なり⁵⁹、それぞれ特異的な組織において、それぞれが相補的な機能、または相反する機能を有するのか、今後のさらなる検討が必要と思われる。

おわりに

本研究では Paxillin がマウス血小板におけるインテグリンを介した双方向の血小板活性化に対する情報伝達を抑制的に制御していることを明らかとした。Paxillin のように複数の経路からのシグナル伝達を抑制する報告はなく、さらに詳細な作用部位を明らかとする必要がある。今回の検討では、ヒト血小板における Paxillin の重要性は不明であるが、ヒト血小板には Hic-5 という Paxillin 類似蛋白質が主に発現しており、Hic-5 がヒト血小板で同様の機能を担っているかどうか興味深い。本研究結果が細胞内蛋白質を標的とした、新たな抗血栓薬の開発に結びつくことに期待したい。さらに、今回の手法により無核の血小板の止血機能を人為的に亢進させることに成功しており、本手法を用いて人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) からの血小板産生において、止血機能を改善した血小板製剤開発に結びつく可能性があると考えている。

引用文献

- 1 Clemetson, K. J. Platelets and primary haemostasis. *Thromb Res* **129**, 220-224, (2012).
- 2 Moroi, M. & Jung, S. M. Platelet glycoprotein VI: its structure and function. *Thromb Res* **114**, 221-233, (2004).
- 3 Watson, S. P., Auger, J. M., McCarty, O. J. & Pearce, A. C. GPVI and integrin alphaIIb beta3 signaling in platelets. *J Thromb Haemost* **3**, 1752-1762, (2005).
- 4 Varga-Szabo, D., Pleines, I. & Nieswandt, B. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**, 403-412, (2008).
- 5 Li, Z., Delaney, M. K., O'Brien, K. A. & Du, X. Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**, 2341-2349, (2010).
- 6 Shattil, S. J., Kim, C. & Ginsberg, M. H. The final steps of integrin activation: the end game. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 288-300, (2010).
- 7 Guidetti, G. F. & Torti, M. The Small GTPase Rap1b: A Bidirectional Regulator of Platelet Adhesion Receptors. *J Signal Transduct* **2012**, 412089, (2012).
- 8 Chrzanowska-Wodnicka, M., Smyth, S. S., Schoenwaelder, S. M., Fischer, T. H. & White, G. C., 2nd. Rap1b is required for normal platelet function and hemostasis in mice. *J Clin Invest* **115**, 680-687, (2005).
- 9 Zhang, G., Xiang, B., Ye, S., Chrzanowska-Wodnicka, M., Morris, A. J., Gartner, T. K., Whiteheart, S. W., White, G. C., 2nd, Smyth, S. S. & Li, Z. Distinct roles for Rap1b protein in platelet secretion and integrin alphaIIbbeta3 outside-in signaling. *J Biol Chem* **286**, 39466-39477, (2011).
- 10 Stefanini, L., Roden, R. C. & Bergmeier, W. CalDAG-GEFI is at the nexus of calcium-dependent platelet activation. *Blood* **114**, 2506-2514, (2009).
- 11 Streuli, C. H. & Akhtar, N. Signal co-operation between integrins and other receptor systems. *Biochem J* **418**, 491-506, (2009).
- 12 Cantor, J. M., Ginsberg, M. H. & Rose, D. M. Integrin-associated proteins as potential therapeutic targets. *Immunol Rev* **223**, 236-251, (2008).
- 13 Lowell, C. A. & Mayadas, T. N. Overview: studying integrins in vivo. *Methods Mol Biol* **757**, 369-397, (2012).
- 14 Bledzka, K., Smyth, S. S. & Plow, E. F. Integrin alphaIIbbeta3: from

- discovery to efficacious therapeutic target. *Circ Res* **112**, 1189-1200, (2013).
- 15 Moser, M., Legate, K. R., Zent, R. & Fassler, R. The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science* **324**, 895-899, (2009).
- 16 Shen, B., Delaney, M. K. & Du, X. Inside-out, outside-in, and inside-outside-in: G protein signaling in integrin-mediated cell adhesion, spreading, and retraction. *Curr Opin Cell Biol* **24**, 600-606, (2012).
- 17 Calderwood, D. A., Campbell, I. D. & Critchley, D. R. Talins and kindlins: partners in integrin-mediated adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**, 503-517, (2013).
- 18 Nieswandt, B., Moser, M., Pleines, I., Varga-Szabo, D., Monkley, S., Critchley, D. & Fassler, R. Loss of talin1 in platelets abrogates integrin activation, platelet aggregation, and thrombus formation in vitro and in vivo. *J Exp Med* **204**, 3113-3118, (2007).
- 19 Moser, M., Nieswandt, B., Ussar, S., Pozgajova, M. & Fassler, R. Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation. *Nat Med* **14**, 325-330, (2008).
- 20 Schmidt, S., Moser, M. & Sperandio, M. The molecular basis of leukocyte recruitment and its deficiencies. *Mol Immunol* **55**, 49-58, (2013).
- 21 Glenney, J. R., Jr. & Zokas, L. Novel tyrosine kinase substrates from Rous sarcoma virus-transformed cells are present in the membrane skeleton. *J Cell Biol* **108**, 2401-2408, (1989).
- 22 Wheeler, G. N. & Hynes, R. O. The cloning, genomic organization and expression of the focal contact protein paxillin in *Drosophila*. *Gene* **262**, 291-299, (2001).
- 23 Schaller, M. D. Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein. *Oncogene* **20**, 6459-6472, (2001).
- 24 Burridge, K., Turner, C. E. & Romer, L. H. Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125FAK accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role in cytoskeletal assembly. *J Cell Biol* **119**, 893-903, (1992).
- 25 Turner, C. E. & Miller, J. T. Primary sequence of paxillin contains putative SH2 and SH3 domain binding motifs and multiple LIM domains: identification of a vinculin and pp125Fak-binding region. *J Cell Sci* **107** (Pt 6), 1583-1591, (1994).
- 26 Brown, M. C. & Turner, C. E. Paxillin: adapting to change. *Physiol Rev* **84**, 1315-1339, (2004).

- 27 Deakin, N. O. & Turner, C. E. Paxillin comes of age. *J Cell Sci* **121**, 2435-2444, (2008).
- 28 Weng, Z., Taylor, J. A., Turner, C. E., Brugge, J. S. & Seidel-Dugan, C. Detection of Src homology 3-binding proteins, including paxillin, in normal and v-Src-transformed Balb/c 3T3 cells. *J Biol Chem* **268**, 14956-14963, (1993).
- 29 Hagmann, J., Grob, M., Welman, A., van Willigen, G. & Burger, M. M. Recruitment of the LIM protein hic-5 to focal contacts of human platelets. *J Cell Sci* **111** (Pt 15), 2181-2188, (1998).
- 30 Osada, M., Ohmori, T., Yatomi, Y., Satoh, K., Hosogaya, S. & Ozaki, Y. Involvement of Hic-5 in platelet activation: integrin alphaIIb beta3-dependent tyrosine phosphorylation and association with proline-rich tyrosine kinase 2. *Biochem J* **355**, 691-697, (2001).
- 31 Rathore, V. B., Okada, M., Newman, P. J. & Newman, D. K. Paxillin family members function as Csk-binding proteins that regulate Lyn activity in human and murine platelets. *Biochem J* **403**, 275-281, (2007).
- 32 Nishiya, N., Tachibana, K., Shibamura, M., Mashimo, J. I. & Nose, K. Hic-5-reduced cell spreading on fibronectin: competitive effects between paxillin and Hic-5 through interaction with focal adhesion kinase. *Mol Cell Biol* **21**, 5332-5345, (2001).
- 33 Deakin, N. O., Ballestrem, C. & Turner, C. E. Paxillin and Hic-5 interaction with vinculin is differentially regulated by Rac1 and RhoA. *PLoS One* **7**, e37990, (2012).
- 34 Wood, C. K., Turner, C. E., Jackson, P. & Critchley, D. R. Characterisation of the paxillin-binding site and the C-terminal focal adhesion targeting sequence in vinculin. *J Cell Sci* **107** (Pt 2), 709-717, (1994).
- 35 Brown, M. C., Perrotta, J. A. & Turner, C. E. Identification of LIM3 as the principal determinant of paxillin focal adhesion localization and characterization of a novel motif on paxillin directing vinculin and focal adhesion kinase binding. *J Cell Biol* **135**, 1109-1123, (1996).
- 36 Cote, J. F., Turner, C. E. & Tremblay, M. L. Intact LIM 3 and LIM 4 domains of paxillin are required for the association to a novel polyproline region (Pro 2) of protein-tyrosine phosphatase-PEST. *J Biol Chem* **274**, 20550-20560, (1999).
- 37 Liu, S., Thomas, S. M., Woodside, D. G., Rose, D. M., Kiosses, W. B., Pfaff,

- M. & Ginsberg, M. H. Binding of paxillin to alpha4 integrins modifies integrin-dependent biological responses. *Nature* **402**, 676-681, (1999).
- 38 Liu, S., Slepak, M. & Ginsberg, M. H. Binding of Paxillin to the alpha 9 Integrin Cytoplasmic Domain Inhibits Cell Spreading. *J Biol Chem* **276**, 37086-37092, (2001).
- 39 Feral, C. C., Rose, D. M., Han, J., Fox, N., Silverman, G. J., Kaushansky, K. & Ginsberg, M. H. Blocking the alpha 4 integrin-paxillin interaction selectively impairs mononuclear leukocyte recruitment to an inflammatory site. *J Clin Invest* **116**, 715-723, (2006).
- 40 Hagel, M., George, E. L., Kim, A., Tamimi, R., Opitz, S. L., Turner, C. E., Imamoto, A. & Thomas, S. M. The adaptor protein paxillin is essential for normal development in the mouse and is a critical transducer of fibronectin signaling. *Mol Cell Biol* **22**, 901-915, (2002).
- 41 Webb, D. J., Donais, K., Whitmore, L. A., Thomas, S. M., Turner, C. E., Parsons, J. T. & Horwitz, A. F. FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol* **6**, 154-161, (2004).
- 42 Chen, G. C., Turano, B., Ruest, P. J., Hagel, M., Settleman, J. & Thomas, S. M. Regulation of Rho and Rac signaling to the actin cytoskeleton by paxillin during Drosophila development. *Mol Cell Biol* **25**, 979-987, (2005).
- 43 Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. & Mello, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811, (1998).
- 44 Carrington, J. C. & Ambros, V. Role of microRNAs in plant and animal development. *Science* **301**, 336-338, (2003).
- 45 Ohmori, T., Kashiwakura, Y., Ishiwata, A., Madoiwa, S., Mimuro, J. & Sakata, Y. Silencing of a targeted protein in in vivo platelets using a lentiviral vector delivering short hairpin RNA sequence. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **27**, 2266-2272, (2007).
- 46 Ohmori, T., Kashiwakura, Y., Ishiwata, A., Madoiwa, S., Mimuro, J., Honda, S., Miyata, T. & Sakata, Y. Vinculin activates inside-out signaling of integrin alphaIIb beta3 in Chinese hamster ovary cells. *Biochem Biophys Res Commun* **400**, 323-328, (2010).
- 47 Wong, C., Liu, Y., Yip, J., Chand, R., Wee, J. L., Oates, L., Nieswandt, B., Reheman, A., Ni, H., Beauchemin, N. & Jackson, D. E. CEACAM1

- negatively regulates platelet-collagen interactions and thrombus growth in vitro and in vivo. *Blood* **113**, 1818-1828, (2009).
- 48 Ming, Z., Hu, Y., Xiang, J., Polewski, P., Newman, P. J. & Newman, D. K. Lyn and PECAM-1 function as interdependent inhibitors of platelet aggregation. *Blood* **117**, 3903-3906, (2011).
- 49 Signarvic, R. S., Cierniewska, A., Stalker, T. J., Fong, K. P., Chatterjee, M. S., Hess, P. R., Ma, P., Diamond, S. L., Neubig, R. R. & Brass, L. F. RGS/Gi2alpha interactions modulate platelet accumulation and thrombus formation at sites of vascular injury. *Blood* **116**, 6092-6100, (2010).
- 50 Liu, S., Kiosses, W. B., Rose, D. M., Slepak, M., Salgia, R., Griffin, J. D., Turner, C. E., Schwartz, M. A. & Ginsberg, M. H. A fragment of paxillin binds the alpha 4 integrin cytoplasmic domain (tail) and selectively inhibits alpha 4-mediated cell migration. *The Journal of biological chemistry* **277**, 20887-20894, (2002).
- 51 Aslan, J. E. & McCarty, O. J. Rho GTPases in platelet function. *J Thromb Haemost* **11**, 35-46, (2013).
- 52 Katoh, K., Kano, Y. & Noda, Y. Rho-associated kinase-dependent contraction of stress fibres and the organization of focal adhesions. *J R Soc Interface* **8**, 305-311, (2011).
- 53 Steffen, A., Ladwein, M., Dimchev, G. A., Hein, A., Schwenkmezger, L., Arens, S., Ladwein, K. I., Margit Holleboom, J., Schur, F., Victor Small, J., Schwarz, J., Gerhard, R., Faix, J., Stradal, T. E., Brakebusch, C. & Rottner, K. Rac function is crucial for cell migration but is not required for spreading and focal adhesion formation. *J Cell Sci* **126**, 4572-4588, (2013).
- 54 Brown, M. C., Cary, L. A., Jamieson, J. S., Cooper, J. A. & Turner, C. E. Src and FAK kinases cooperate to phosphorylate paxillin kinase linker, stimulate its focal adhesion localization, and regulate cell spreading and protrusiveness. *Mol Biol Cell* **16**, 4316-4328, (2005).
- 55 Turner, C. E. Paxillin interactions. *J Cell Sci* **113 Pt 23**, 4139-4140, (2000).
- 56 Gupta, S., Braun, A., Morowski, M., Premisler, T., Bender, M., Nagy, Z., Sickmann, A., Hermanns, H. M., Bosl, M. & Nieswandt, B. CLP36 is a negative regulator of glycoprotein VI signaling in platelets. *Circ Res* **111**, 1410-1420, (2012).
- 57 Kim-Kaneyama, J. R., Miyauchi, A., Lei, X. F., Arita, S., Mino, T., Takeda, N., Kou, K., Eto, K., Yoshida, T., Miyazaki, T., Shioda, S. & Miyazaki, A.

- Identification of Hic-5 as a novel regulatory factor for integrin α IIb β 3 activation and platelet aggregation in mice. *J Thromb Haemost* **10**, 1867-1874, (2012).
- 58 Chew, V. & Lam, K. P. Leupaxin negatively regulates B cell receptor signaling. *J Biol Chem* **282**, 27181-27191, (2007).
- 59 Yuminamochi, T., Yatomi, Y., Osada, M., Ohmori, T., Ishii, Y., Nakazawa, K., Hosogaya, S. & Ozaki, Y. Expression of the LIM proteins paxillin and Hic-5 in human tissues. *J Histochem Cytochem* **51**, 513-521, (2003).

謝辞

本論文作成にあたり，ご指導ご鞭撻を賜りました，自治医大分子病態治療研究センター分子病態治療研究部安本篤先生，柏倉裕志博士，およびスタッフの皆様方，自治医大循環器内科 苅尾七臣教授，日本医科大学形態解析共同研究施設 鈴木英紀准教授に謹んで感謝申し上げます。