

特集：細胞外プロテオリシス研究の最前線

ADAM28：ヒト癌細胞の増殖・浸潤・転移への関与

望 月 早 月, 岡 田 保 典

ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) 遺伝子ファミリーの提唱から10数年余りが過ぎ、ADAM分子の生理的および病的状態での機能が明らかになりつつある。ADAMは、プロテアーゼとして細胞膜タンパク質のシェディング (shedding) に中心的な役割を果たすとともに、インテグリンをはじめとしたタンパク質との結合を介して細胞内シグナルを調節する。ADAM28は、ADAM分子の中でもヒト肺癌や乳癌において癌細胞特異的に高発現しており、増殖因子代謝や細胞膜タンパク質との相互作用により癌細胞の増殖・浸潤・転移に関わっている。また、血中ADAM28レベルの測定は、肺癌の診断や病勢のモニターに使用できる可能性があり、ADAM28を標的とした癌の診断・治療法への応用が期待される。

はじめに

ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) は、ディスインテグリン (ヘビ毒から単離された血小板凝集阻害因子) とメタロプロテアーゼ (Zn^{2+} を活性中心に持つプロテアーゼ) ドメインを有する膜貫通型タンパク質からなる遺伝子ファミリーであり、細胞膜上の増殖因子・受容体・接着分子のシェディングやインテグリンなどへの結合により細胞の接着・運動・増殖に関与する多機能分子である。ADAMの研究はPrimakoffら¹⁾やBlobelら²⁾による受精に関わる精子表面タンパク質fertilin α (ADAM1) とfertilin β (ADAM2) の発見を契機に始まった。ADAMは受精や形態形成などの発生・発育といった生理的現象に加えて³⁾、心肥大⁴⁾、癌細胞の増殖・転移^{5,6)}、アルツハイマー病⁷⁾、てんかんやけいれん⁸⁾などに関与することが明らかとなり、近年世界的に注目されるようになってきた。

本総説では、ADAM遺伝子ファミリーについて概説す

るとともに、ADAM分子の中でも構造的にヘビ毒メタロプロテアーゼと最もホモロジーが高いADAM28に関して、その生化学的性質と癌細胞の増殖・浸潤・転移での作用を解説する。なお、本稿では悪性上皮性腫瘍 (癌腫) を表す際に「癌」、悪性腫瘍一般を総称する場合は「がん」として記載する。

1. ADAM 遺伝子ファミリー

ADAMは、スプライシングバリエーションを有する若干の例外を除けばすべて膜タンパク質であり、N末端よりプロドメイン、メタロプロテアーゼドメイン、ディスインテグリンドメイン、システインリッチドメイン、細胞膜貫通ドメイン、細胞内ドメインから構成されている。ADAMの兄弟遺伝子ファミリーとして、細胞膜貫通ドメインと細胞内ドメインを欠失し、トロンボスポンジンタイプIモチーフを持つ分泌型タンパク質のADAMTS (ADAM with thrombospondin motifs) が知られている。ヒトゲノム解析データより、ADAM遺伝子ファミリー分子として25種類の遺伝子が同定されており、そのうち4種類は偽遺伝子である⁹⁾。したがって、ヒトでは21種類のADAMタンパク質が産生され、そのうちHEXGHXXGXXHD配列を活性中心に有するプロテアーゼ型ADAM分子は13種類であり、他の8種類は非プロテアーゼ型ADAMである (表1)。ADAMとMMP (matrix metalloproteinase) 遺伝子ファミリー

慶應義塾大学医学部病理学教室 (〒160-0016 東京都新宿区信濃町 35)

ADAM28: Involvement in cancer cell proliferation, invasion and metastasis

Satsuki Mochizuki and Yasunori Okada (Department of Pathology, School of Medicine, Keio University, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-0016, Japan)

表 1 ヒト ADAM 遺伝子ファミリー

ADAM	別名	酵素型 (P) 非酵素型 (NP) splice variants (isoforms)	機能・特徴	基質	Integrin-binding	発現部位
ADAM2	PH-30 β , Fertilin- β	NP	Sperm/egg binding/fusion		$\alpha 4\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$	Testis
ADAM7	EAP I, GP-83	NP			$\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$, $\alpha 9\beta 1$	Testis, erythrocyte
ADAM8	MS2 (CD156)	P	Sheddase, neutrophil infiltration	CD23, proTNF α , RANKL		Macrophage, neutrophil
ADAM9	MDC9, MCMP, Meltrin- γ	P, Secreted form	Sheddase, cell migration	ProHB-EGF, TNF-p75 receptor, APP, fibronectin, gelatin,	$\alpha 2\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 9\beta 1$, $\alpha V\beta 5$	Various tissues
ADAM10	MDAM, Kuzbanian	P	Sheddase, development, angiogenesis	ProTNF- α , collagen IV, gelatin, myelin basic protein, Delta, APP, L1, CD44, proHB-EGF, Notch, Delta-like 1, Jagged, N-cadherin, E-cadherin, VE-cadherin, Ephrin A2, Ephrin A5, FASL, IL6R		Kidney, brain, chondrocyte
ADAM11	MDC	NP, Secreted form	Tumor suppressor gene			Brain
ADAM12	Meltrin- α , MCMP, MLTN, MLTNA	P, Secreted form	Sheddase, myogenesis, adipogenesis	ProHB-EGF, IGFBP-3 and 5, proepiregulin, collagen IV, gelatin, fibronectin	$\alpha 4\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$	Osteoblast, muscle, chondrocyte, placenta
ADAM15	Metargidin, MDC15, AD56, CR II-7	P, Cytoplasmic form	Arteriosclerosis, angiogenesis	Collagen IV, gelatin	$\alpha V\beta 3$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$	Smooth muscle cell, chondrocyte, endothelial cell, osteoclast, synovial cells
ADAM17	TACE, cSVP	P	Sheddase, heart development	ProTNF- α , proTGF- α , TNF-p75 receptor, ErbB4, TRANCE, proHB-EGF, proamphiregulin, proepiregulin, APP, IL6R, CD44, L-selectin	$\alpha 5\beta 1$	Macrophage, various tissues
ADAM18	ADAM27, tMDC III	NP				Testis
ADAM19	Meltrin- β , FKSG34	P, N-terminal form	Sheddase, formation of neuron and cardiovascular organs	Proneuregulin, RANKL	$\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$	Various tissues
ADAM20		P	Formation of sperm			Testis
ADAM21	ADAM31	P				Testis
ADAM22	MDC2	NP, Cytoplasmic form	Regulate synaptic transmission, epilepsy			Brain
ADAM23	MDC3	NP	Tumor suppressor gene, epilepsy		$\alpha V\beta 3$	Brain, heart
ADAM28	e-MDC II, MDC-Lm, MDC-Ls	P, Secreted form	Growth factor metabolism	Myelin basic protein, IGFBP-3, CD23, Aggrecan	$\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$, $\alpha 9\beta 1$	Lung, lymphocyte, gastrointestinal system, pancreas, pituitary gland
ADAM29	svph 1	NP				Testis
ADAM30	svph 4	P				Testis
ADAM32	AJ131563	NP				Testis
ADAM33		P	Genetically related to bronchial asthma	APP, KL-1, insulin B chain	$\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$	Lung (fibroblast, smooth muscle), uterus
ADAMDEC1		P				Lymphatic system, gastrointestinal system

略語：HB-EGF, heparin-binding epidermal growth factor; APP, amyloid precursor protein; TNF, tumor necrosis factor; RANKL, receptor activator of nuclear factor κ B ligand; IGFBP-3, insulin-like growth factor binding protein-3; TGF, transforming growth factor; IL6R, interleukin-6 receptor; KL-1, Kit-ligand-1; ADAMDEC1, ADAM-like decysin 1. ADAM1, 3, 4, 5 は偽遺伝子であり、本表からは削除している。

は、近縁遺伝子ファミリーであり、両者はプロドメインとメタロプロテアーゼドメインを共有している。MMPは、主として細胞外マトリックス (extracellular matrix: ECM) を基質とするのに対し、ADAMのECM分解活性は限定的であり、主要な作用は膜タンパク質の細胞外ドメインを切断・遊離するシェディングにあると考えられている (表1)。ADAM分子のうち作用解析が最も進んでいるのは、ADAM17 (別名 tumor necrosis factor- α converting enzyme: TACE) である。遺伝子改変マウスを用いた研究から、ADAM17はTNF- α のみならずトランスフォーミング増殖因子- α (TGF- α) や heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF) などの膜型増殖因子のシェディングに中心的な役割を果たすとされている¹⁰⁾。一方、ADAM12は、G-protein coupled receptor (GPCR) 刺激による細胞内シグナルで活性化され、膜型HB-EGFのシェディングを通してEGF受容体を刺激することが知られており⁴⁾、GPCRとチロシンキナーゼ系受容体間のクロストークの一例として有名である。ADAM9, ADAM10, ADAM17は、アミロイド前駆体タンパク質を分解する α -セクレターゼとしても知られている¹¹⁾。また、ADAM19は、発生過程において、心臓神経堤細胞や心血管内皮細胞、末梢神経系で強く発現し、それらの組織で発現するニューレグリン (neuregulin) のシェディングに関与している¹²⁾。非プロテアーゼ型

ADAMでは、ADAM22とADAM23が神経シナプ스에서働く特殊な分泌タンパク質LGI1と結合して脳内のシナプス伝達を調節しており、これらの分子結合破綻でてんかん発作が発症する⁸⁾。また、ADAM23は α v β 3インテグリンとの結合によりインテグリン活性を抑制するとされ¹³⁾、ADAM11はがん抑制遺伝子産物と報告されている¹⁴⁾。

2. ADAM28の構造

ADAM28遺伝子は、1999年にヒトリンパ節cDNAライブラリーからクローニングされた¹⁵⁾。ADAM28にはスプライスバリエーションとして膜型ADAM28 (MDC-Lm) と分泌型ADAM28 (MDC-Ls) が存在し¹⁵⁾、現在ではADAM28mおよびADAM28sと呼ばれている¹⁶⁾。ADAM28mは、775アミノ酸 (分子量87 kDa) からなるI型膜貫通タンパク質で、N末端側からプロドメイン、メタロプロテアーゼドメイン、ディスインテグリンドメイン、システインリッチドメイン、EGF様ドメイン、細胞膜貫通ドメイン、細胞内ドメインからなる (図1)。ADAM28sは、540アミノ酸 (分子量65 kDa) からなるタンパク質で、ディスインテグリンドメインまではADAM28mと同じ構造を持ち、その下流に短いシステインリッチドメインと分泌型特異的ドメインを有する (図1)。ADAM28のメタロプロテアーゼドメインには、HEMGHNFGMFHDの配列があり、3個のヒ

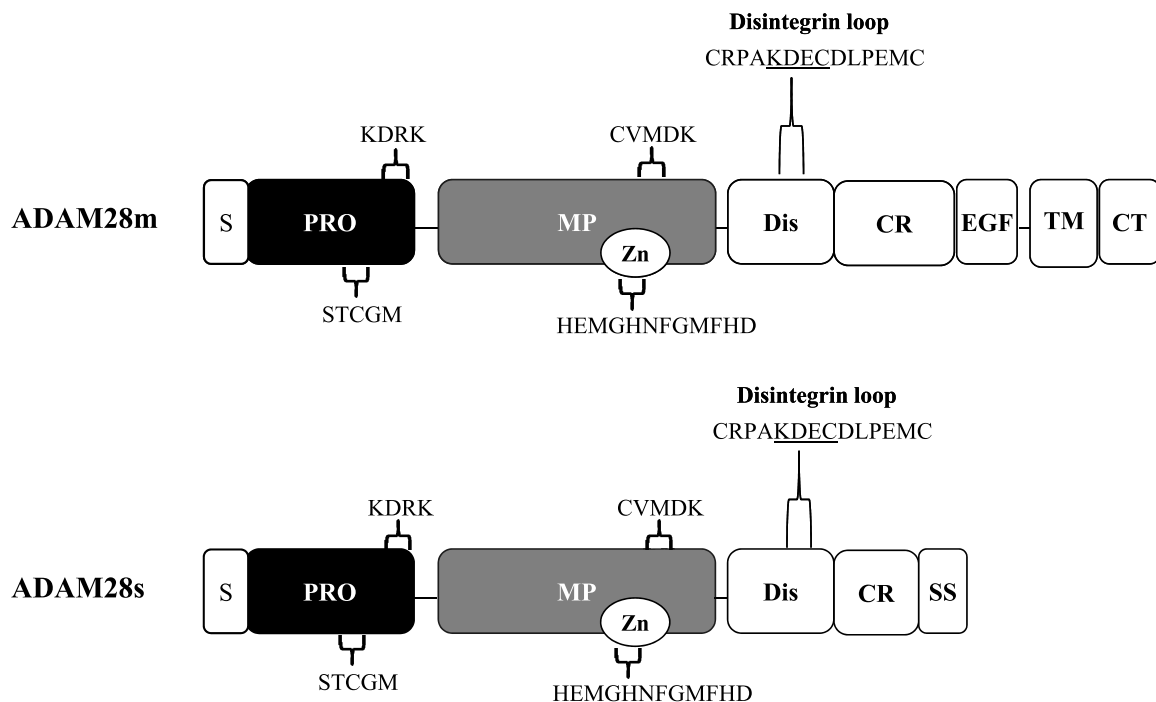


図1 膜型ADAM28mと分泌型ADAM28sのドメイン構造

ADAM28mは、シグナル配列 (S)、プロドメイン (PRO)、メタロプロテアーゼドメイン (MP)、ディスインテグリンドメイン (Dis)、システインリッチドメイン (CR)、EGF様ドメイン (EGF)、細胞膜貫通ドメイン (TM)、細胞内ドメイン (CT) から構成されている。一方、ADAM28sではTMやCTが欠損し、Disの下流に短いCRと分泌型特異的ドメイン (SS) が存在する。

スチジン残基に Zn^{2+} が配位することで活性中心を形成している (図 2)。また、その下流にはメチオニン残基を含む Met-turn 構造 (CVMDK) が存在し、活性中心の構造を補強している。ADAM28 のプロドメインには、STCGM 配列があり、この中のシステイン残基におけるチオール基が

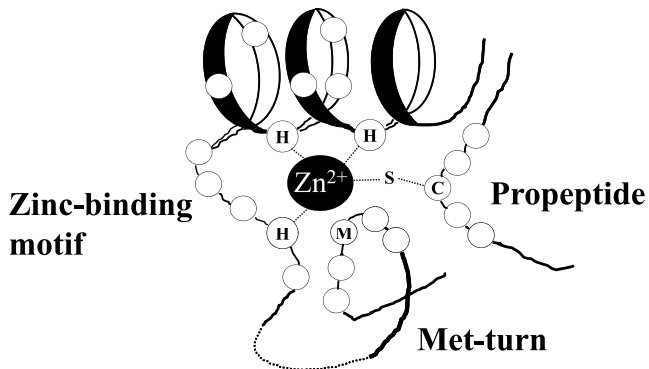


図 2 潜在型 ADAM28 活性中心の構造

活性中心には zinc-binding motif があり、3 個のヒスチジン残基が Zn^{2+} に配位し、Met-turn 構造により補強されている。また、プロドメインに存在する STCGM 配列のシステイン残基は、活性中心の Zn^{2+} に配位することによりプロペプチドが活性中心を覆い潜在性を保持している。

活性中心の Zn^{2+} に対する第 4 の配位子として機能し、ペプチド結合の加水分解に必要な水分子と Zn^{2+} との結合を妨げている (図 2)。このシステイン残基を中心としたプロドメインは、メタロプロテアーゼドメインに覆い被さることにより潜在型における不活性状態を維持している (図 2, 図 3)。ADAM 分子の多くは、プロドメインとメタロプロテアーゼドメインの間にプロホルモンプロセシング酵素であるフーリン認識配列 (RX[R/K]R) が存在し¹⁷⁾、フーリンによるプロドメインの切断で活性化を受ける。しかし、ADAM28 にはフーリン認識配列が存在せず、活性化にはフーリン以外のプロテアーゼによる切断や他の活性化機構の存在が推定される。いずれにしても活性化に伴い、潜在型 ADAM28 のプロドメインは切離され、低分子化した活性型 ADAM28 となる (図 3)。ADAM28 のディスインテグリンドメインには RGD 配列は存在しないが、RGD に相当する KDEC⁴⁷² の配列があり、ディスインテグリンループを構成する (図 1)。ADAM やヘビ毒メタロプロテアーゼに関する結晶構造解析の結果から (武田らの章を参照)、ADAM のメタロプロテアーゼドメイン、ディスインテグリンドメイン、システインリッチドメインは、全体として細胞膜上で C 字型の構造を持つと推定さ

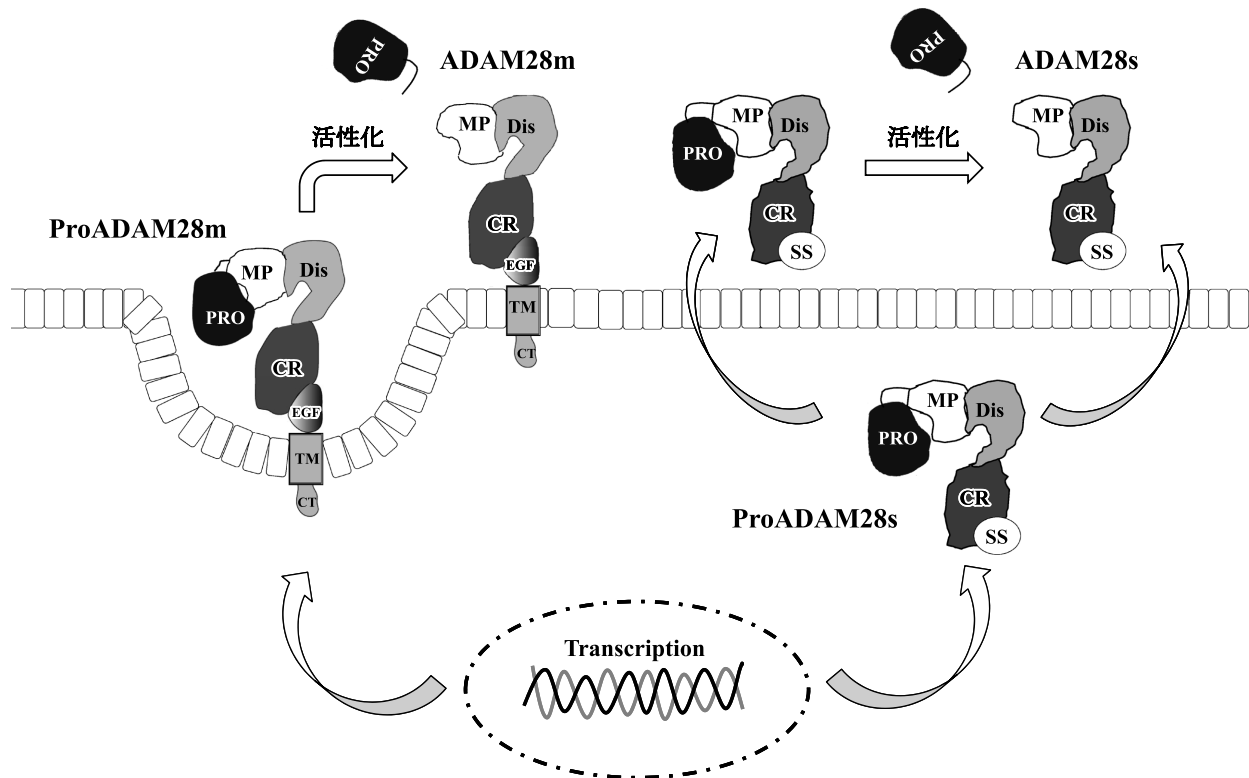


図 3 ADAM28m と ADAM28s の構造と活性化

ADAM28 は、メタロプロテアーゼドメイン (MP)、ディスインテグリンドメイン (Dis)、システインリッチドメイン (CR) により C 字型の構造を呈すると推定される。潜在型 ADAM28 の活性化部位については、細胞内あるいは細胞膜上かはなお不明である。しかし、いずれにしても活性化に伴いプロドメインは切断され、低分子化する。PRO, プロドメイン; EGF, EGF 様ドメイン; TM, 細胞膜貫通ドメイン; CT, 細胞内ドメイン; SS, 分泌型特異的ドメイン。

れている (図3)。本結晶構造解析の結果から考えると、ADAM28のKDEC⁴⁷²配列末端とシステインリッチドメインのシステイン残基間はジスルフィド結合 (C⁴⁷²/C⁵⁰⁴) が形成され、ディスインテグリンループ全体が次に続くシステインリッチドメインと相互作用をするため、同ループヘインテグリンが直接結合できる可能性は低いと考えられている¹⁸⁾。

3. ADAM28の発現と発現調節機構

生理的組織においてADAM28mは主としてリンパ節などのリンパ系組織で発現し、ADAM28sは脾臓で発現すると報告されている¹⁵⁾。また、イムノブロット解析では、ADAM28mはBリンパ球とTリンパ球で87 kDaのタンパク質として検出されている¹⁵⁾。一方、ADAM28は活性化した肝星細胞で発現し、肝臓の線維化に関与する可能性が指摘されている¹⁹⁾。我々の研究グループは、ヒト乳癌と非小細胞肺癌組織において11種類のメタロプロテアーゼ型ADAMの遺伝子発現を網羅的にスクリーニングし、ADAM28が癌組織特異的に高発現することを見出した。イムノブロット解析の結果、ADAM28mは55/57 kDa、ADAM28sは42 kDaの活性型酵素として癌組織内で存在していた^{20, 21)}。肺腺癌組織でのADAM28の特異的発現は、オーストラリアの研究グループによっても確認されている²²⁾。頭頸部扁平上皮癌組織では55 kDaのADAM28mと42 kDaのADAM28sの発現が報告されており²³⁾、腎癌細胞でもADAM28の発現が知られている²⁴⁾。また、定量PCRや免疫組織化学的検討において、悪性度の高い軟骨肉腫組織でADAM28が高発現し、ADAM28が軟骨肉腫と内軟骨腫の鑑別診断に役立つ可能性が示唆されている²⁵⁾。

ADAM分子の発現調節機構に関する情報は少ないが、転写因子であるFoxm1のノックアウトマウスではADAM17の発現が90%抑制されることから、ADAM17の発現にFoxm1の関与が示唆されている²⁶⁾。星状神経膠細胞をTNF- α 刺激すると転写因子であるIRF1の活性化を介してADAM8が発現誘導され²⁷⁾、ヒト前立腺癌細胞では活性酸素によりADAM9の発現上昇が報告されている²⁸⁾。肝星細胞をTGF- β で処理するとホスファチジルイノシトール3-キナーゼ (PI3キナーゼ) やmitogen-activated protein kinase (MAPキナーゼ) を介してADAM12が発現する²⁹⁾。我々は、関節軟骨細胞においてもADAM12がTGF- β で選択的に発現上昇することを報告している³⁰⁾。

ADAM28の発現調節機構については、ヒト単球細胞株 (THP-1) ではホルボールミリステートアセテート (PMA) 刺激で発現上昇し、9-シスレチノイン酸処理でさらに発現亢進することが報告されている³¹⁾。また、THP-1細胞を低比重リボタンパク質 (LDL) で処理することでADAM28発現が上昇することも知られている³²⁾。一方、ヒト軟骨細

胞ではオールトランスレチノイン酸処理でADAM28が発現誘導されると報告されている³³⁾。我々も肺癌細胞や乳癌細胞をPMAやオールトランスレチノイン酸で刺激するとADAM28発現の上昇を認めており、ADAM28の発現調節にはプロテインキナーゼCもしくはレチノイン酸核レセプターのシグナル伝達系の関与が考えられる。一方、乳癌や肺癌などで癌細胞特異的に発現がみられることから、がん遺伝子による形質転換がADAM28発現に関与すると推定される。

4. ADAM28の基質と結合タンパク質

ADAM28は、ADAM分子の中でもヘビ毒メタロプロテアーゼ (snake venom metalloproteinase: SVM) と最も類似性が高いとされている¹⁶⁾。このことから、ADAM28がSVMの基質であるIV型コラーゲンやフォンビルブランド因子 (VWF) を分解することも想像されるが、ADAM28の基質に関する情報は限られている。ここでは、これまでに報告されてきたADAM28の基質と結合タンパク質について解説する。

Myelin basic protein (MBP) : MBPをリコンビナントADAM28とインキュベーションすると、MBPは2箇所切断されることから、ADAM28のプロテアーゼ活性が初めて証明された³⁴⁾。MBPは神経細胞軸索を層状に取り囲むミエリン (髄鞘) の主要タンパク質で、中枢神経ミエリンタンパク質の約1/3を占めている。MBPはMMPやADAM分子をはじめ多くのプロテアーゼで非特異的に分解されるが、ADAM28によるMBP分解の生理的あるいは病的意義については不明である。

CD23 : CD23は膜貫通型糖タンパク質で低親和性のIgEレセプター (Fc ϵ R II) であり、Bリンパ球、単球、濾胞樹状細胞に発現している³⁵⁾。気管支喘息、関節リウマチ、炎症性腸疾患などの疾患において可溶性CD23の出現が知られている³⁶⁾。Fourieら³⁷⁾は、49種類のペプチドを用いて基質のスクリーニングを行い、ADAM28がCD23の合成ペプチド分解活性を有し、ADAM8とADAM15にも同様な活性を認めている。

IGFBP-3 (insulin-like growth factor binding protein 3) : インスリン様増殖因子 (IGF) は、成長ホルモンの影響下に種々の組織によって産生される細胞成長制御ペプチドであり、組織内ではIGFの大部分は特異的結合タンパク質であるIGFBPとの複合体として存在する。ヒトでは10種類のIGFBPがクローニングされており、IGFBP-1~6とIGFBP-7~10はそれぞれ高親和性と低親和性のIGF結合能を有している。IGFBP-1~10のうちでIGFBP-3は最も高濃度で血中に存在しており³⁸⁾、IGFが持つ増殖・分化・抗アポトーシスなどの作用は、IGFBP-3の選択的分解によるIGF/IGFBP-3複合体からのIGF遊離によって調節されて

いる³⁹⁾。我々は、ADAM28がIGFBP-3をその中心領域で切断し、IGF-Iを複合体から遊離することを見出した⁴⁰⁾。IGFBP-3分解酵素には、MMP-1, -2, -3, -7, -19⁴¹⁻⁴⁴⁾、ADAM12⁴⁵⁾など、多種類のプロテアーゼが知られている。これらのMMPやADAM分子のいくつかは癌組織内で発現していることから、*in vivo*で作用するIGFBP-3分解酵素を特定することは必ずしも容易ではない。しかし、MMPの多くは潜在型酵素として存在していることや、ヒト乳癌組織をADAM28に対するsiRNAや中和抗体で処理するとIGFBP-3分解が抑制されるのに対し、ADAM12に対するsiRNAでは抑制されないことから、ヒト乳癌組織ではADAM28がIGFBP-3分解酵素として作用すると推測される²⁰⁾。

アグリカン：関節軟骨のECM成分は、II型コラーゲンとプロテオグリカンであるアグリカンが主体である。関節リウマチや変形性関節症における関節軟骨破壊の際には、アグリカンコアタンパク質のGlu³⁷³-Ala³⁷⁴ボンド間の切断で形成されたフラグメントが中心的に出現することから、この部位を切断するアグリカナナーゼと呼ばれるADAMTS 1, 4, 5, 8, 9, 15, 16, 18, 20が注目されている⁴⁶⁻⁴⁸⁾。ADAM28はアグリカンを分解すると報告されているが³³⁾、アグリカナナーゼ活性を有するかは不明である。

P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1)：PSGL-1 (別名CD162)はP-セレクトリン(CD62P)のリガンドであり、分子量220 kDaのジスルフィド結合ホモダイマーとして発現するI型膜貫通タンパク質である。本分子はシアロムチンファミリーに属し、末梢血の好中球、単球のみならずT細胞やある種の癌細胞での発現が報告されている^{49,50)}。我々の研究グループでは、酵母ツーハイブリッドシステムでADAM28相互作用タンパク質を網羅的に探索し、PSGL-1を同定した⁵¹⁾。ADAM28のディスインテグリンドメインはPSGL-1細胞外ドメインのdecamer repeatと結合し、本結合によりPSGL-1/P-セレクトリンを介した炎症細胞の血管内皮細胞へのローリング・接着・浸潤を亢進し、ADAM28が炎症局所での炎症細胞浸潤を促進することを実験的に明らかにしている⁵¹⁾。

インテグリン ($\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$, $\alpha 9\beta 1$)：ADAMのディスインテグリンドメインはヘビ毒ディスインテグリンとホモロジーを有することから、ADAMがインテグリンのリガンドとなる可能性が古くから考えられてきた。インテグリンは α 鎖と β 鎖のヘテロ二量体からなる機能分子であり、24種類の $\alpha\beta$ ヘテロ二量体が確認されている⁵²⁾。アミノ酸配列、リガンド、機能の違いに基づいて、①RGD受容体型 ($\alpha 5$, $\alpha 8$, αv , αII)、②コラーゲン受容体型 ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 10$, $\alpha 11$)、③ラミニン受容体型 ($\alpha 3$, $\alpha 6$, $\alpha 7$)、④白血球受容体型 (αL , αM , αX , αD)、⑤それ以外の型 ($\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$, $\alpha 9\beta 1$) の5グループに分類されている⁵²⁾。表1の

ように、ADAM28を含めた多くのADAM分子(ADAM 2, 7, 9, 12, 15, 28, 33)は $\alpha 9\beta 1$ との結合能を有し、ADAM28は白血球で発現する $\alpha 4\beta 1$ や $\alpha 4\beta 7$ とも結合する^{52,53)}。ADAM分子はディスインテグリンループにあるR(X5)CDLPEMの配列(図1)を介して $\alpha 9\beta 1$ インテグリンと結合すると報告されている⁵⁴⁾。一方、Bridgesら⁵³⁾は、ADAM28と $\alpha 4\beta 1$ インテグリンの結合は、上記の配列に加えて、ディスインテグリンループの外側に位置するいくつかのアミノ酸(Lys⁴³⁷, Lys⁴⁴², Lys⁴⁵⁵, Lys⁴⁵⁹, Lys⁴⁶⁰, Lys⁴⁶⁹, Glu⁴⁷⁶)が必須であることを示している。いずれにしても、ADAM28はインテグリンとの結合を介してプロテアーゼ活性非依存性に細胞の接着や運動を促進もしくは抑制する可能性が考えられる。

5. ADAM28の活性調節機構

生体内でのADAM分子の酵素活性は、遺伝子発現、潜在型酵素の活性化、インヒビターによる阻害の各ステップで制御されているが、ADAM28の活性調節機構についてはなお不明な点が多い(図4)。遺伝子発現については前述したので、ここではそれ以外の調節機構について解説する。

潜在型ADAM28の活性化：ADAM分子のうちADAM 9, 10, 12, 15, 17, 19は、プロドメイン末端にフューリン認識配列(RX[K/R]R)を有し、細胞内でフューリンや関連のプロテアーゼにより活性化され、細胞膜表面に移動すると考えられている。しかし、ADAM28には本配列がなく、マウス潜在型ADAM28はゴルジ内で自己触媒作用により活性化されると考えられる¹⁶⁾。潜在型のADAM8, ADAM15, ADAM28は4°C保存中に自発的に活性化すると報告されており³⁷⁾、潜在型ADAM8の自発的活性化にはC末端ドメイン(ディスインテグリン、システインリッチ、EGF様各ドメイン)が必要とされている⁵⁵⁾。我々の検討では、潜在型ADAM28を37°Cで3日間以上インキュベーションすると、部分的な活性化を認めている。潜在型ADAM12はN-エチルマレイミド処理により活性化されるが⁵⁶⁾、潜在型ADAM28はN-エチルマレイミドや4-aminophenylmercuric acetateでは活性化されなかった。一方、潜在型ADAM28を活性型MMP-1, 2, 3, 7, 9, 13で処理すると、MMP-7活性によってのみ活性化され、MMP-7は潜在型ADAM28の活性化因子として作用すると推定される⁴⁰⁾。ナルディライシンはHB-EGFに結合するタンパク質であるが、細胞膜上でADAM17と会合してADAM17の活性制御に関わっている⁵⁷⁾(西らの章を参照)。また、弾力繊維の構成成分の一つであるmicrofibril-associated glycoprotein-2 (MAGP-2)は、Jagged1 (Notchのリガンド)と結合し、ADAM17によるJagged1のシェディングを促進することが報告されている⁵⁸⁾。ADAM28は癌

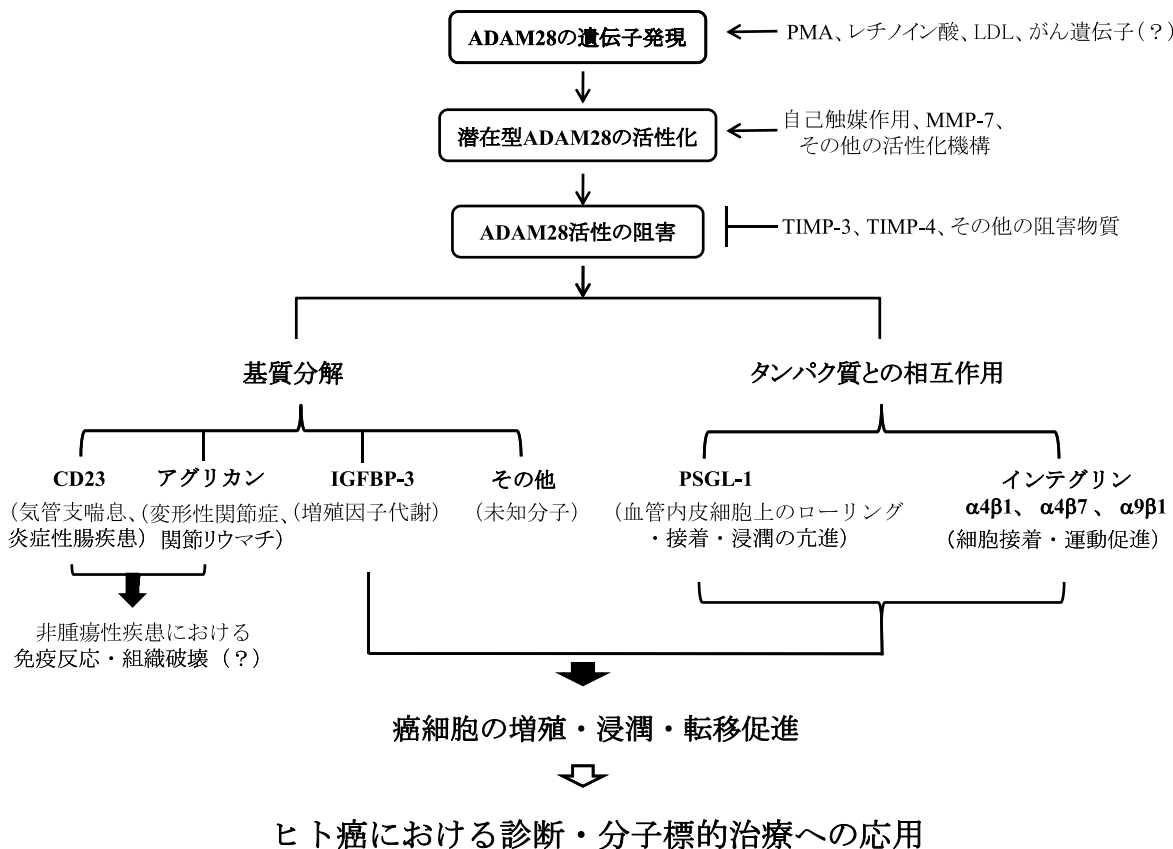


図4 ヒト癌細胞の増殖・浸潤・転移における ADAM28 の作用

ADAM28 は乳癌や肺癌細胞で発現し、活性化を受け、インヒビターとの不均衡をもとに、基質分解あるいはタンパク質相互作用を介して、癌細胞の増殖・浸潤・転移促進に働く。

細胞や癌組織では、常に 42 kDa と 55 kDa の活性型酵素として検出されており^{20, 21, 23)}、細胞や組織中には効率的な活性化機構が存在すると考えられる。潜在型 ADAM28 タンパク質の限定分解や、相互作用分子による立体構造変化に基づく潜在型 ADAM28 活性化機構の解明は、今後の重要な研究課題である。

Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) による ADAM28 の活性制御：活性型 MMP に共通なインヒビターである TIMP には 4 種類の分子 (TIMP-1, 2, 3, 4) が区別されている⁵⁹⁾。TIMP の分子量は 21-28 kDa であり、相互に 40-50% のホモロジーを持つ。TIMP のインヒビタードメインは N 末端側領域にあり、MT-MMP の TIMP-1 不応答を除けば、いずれの TIMP も 1:1 のモル比で MMP 活性を阻害する⁶⁰⁾。一方、TIMP の中で ADAM の酵素活性を阻害するのは、主に TIMP-3 である。ADAM28 に関しては、TIMP-3 と TIMP-4 がインヒビターとして機能するのに対し、TIMP-1 や TIMP-2 の阻害活性はきわめて弱い⁴⁰⁾。TIMP-1 や TIMP-2 がインヒビターとして作用しないことは、ADAM28 の活性調節に TIMP 以外の組織由来インヒビター分子や MMP とは異なる調節機構が存在する

ことを示唆している。RECK (reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs) は、*ras* がん遺伝子で形質転換した NIH3T3 細胞を正常復帰させる遺伝子として単離された膜結合型 (GPI-アンカー) タンパク質で、MT1-MMP, MMP-2, MMP-7 などの酵素活性のインヒビターとして作用する⁶¹⁾。しかし、RECK は ADAM10 の活性を阻害することから⁶²⁾、ADAM28 を含めた他の ADAM 分子へのインヒビター活性の検討が必要である。

6. ADAM28 の癌細胞増殖・浸潤・転移での役割

種々のヒト癌細胞が ADAM8, 9, 10, 12, 15, 17, 19, 28 を発現することが報告されている^{5, 6)}。我々は、ヒト乳癌組織や非小細胞肺癌組織において ADAM28 が癌細胞で高発現し、ADAM28m と ADAM28s の mRNA レベルは癌細胞の増殖マーカーである MIB-1 陽性細胞率と正の相関を示すことから、ADAM28 はこれら癌細胞の増殖に関与する可能性を見出した^{20, 21)}。また、ADAM28 高発現乳癌細胞株 (MDA-MB231) では、ADAM28 の発現ないし活性の特異的な阻害により IGFBP-3 の分解と IGF-I 誘導性細胞増殖が抑制された。さらに、ヌードマウス皮下に移植された

同細胞株の腫瘍増殖は ADAM28 に対する siRNA の投与により抑制された。これらの実験データから、乳癌細胞由来の ADAM28 は IGFBP-3 の分解により IGF-I/IGFBP-3 複合体より IGF-I を遊離し、乳癌細胞の増殖促進に作用することが強く示唆された²⁰⁾。

ヒト非小細胞肺癌においては、ADAM28 の発現レベルは癌細胞の増殖のみならずリンパ節転移と正の相関を示し、ADAM28 が癌細胞の浸潤・転移にも関与する可能性が示唆された²¹⁾。我々は ADAM28 を高発現するヒト肺癌細胞株 (PC-9 細胞) においてルシフェラーゼを恒常的に発現する安定細胞株を樹立し、NOD/SCID マウス尾静脈内注入による転移モデルを開発した。本癌細胞株での ADAM28 遺伝子発現を short hairpin RNA や siRNA で抑制すると肺転移が有意に抑制されることを認めており、ADAM28 が癌細胞の浸潤・転移にも重要な役割を果たすことを示している (論文投稿準備中)。

ADAM28 の新規基質や相互作用分子を酵母ツーハイブリット法を用いてヒト肺 cDNA ライブラリーより網羅的に探索した結果、ADAM28 の結合タンパク質として PSGL-1⁵¹⁾ や VWF などを見出している。PSGL-1 は一部の癌細胞株で発現することから^{49, 50)}、癌細胞で産生された ADAM28 が癌細胞膜上の PSGL-1 と結合することで、PSGL-1/P-セレクチンを介した血管内皮細胞上での癌細胞のローリングと内皮細胞間通過プロセスを亢進する可能性が考えられる。VWF は一部のマウス癌細胞株に対してアポトーシスを誘導することが報告されており⁶³⁾、VWF ノックアウトマウスを用いた実験では癌転移が促進するとされている⁶⁴⁾。また、進行癌患者においては血中 VWF の分解が亢進しており、その分解には生理的な VWF 分解酵素 (ADAMTS-13) とは異なるプロテアーゼ活性が関与するとされている⁶⁵⁾。これらのことから、ADAM28 は VWF と結合ないし分解することにより、VWF 促進性癌細胞アポトーシスの抑制を通して癌細胞の浸潤・転移に関わる可能性が推定される (論文投稿準備中)。

7. ADAM28 の診断・治療への応用

これまでの我々の研究から、ADAM28 はヒト肺癌と乳癌細胞の増殖・浸潤・転移に関わる最も重要な ADAM 分子の一つと考えられる (図 4)。ADAM28 は癌細胞ではほぼ特異的に発現されることから、癌組織中で産生された ADAM28 は血中へと吸収され、肺癌患者では末梢血中に検出できると推測される。実際、我々は抗 ADAM28 モノクローナル抗体を用いた ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 系を開発し、非小細胞肺癌患者では血清中 ADAM28 濃度が健常者より有意に高値であり、肺癌の臨床病期、リンパ節転移、腫瘍径、再発の有無と正の相関を示すことを明らかにした⁶⁶⁾。また、血清中 ADAM28 レベ

ルは、病期 I 期の早期肺癌においても有意に上昇しており、肺癌診断に用いられている carcinoembryonic antigen より感度と特異性の点で優れていた。これらのデータは、ADAM28 を標的とした ELISA 系は非小細胞肺癌の診断や病勢の非侵襲的モニター法として有望であることを示唆している⁶⁶⁾。

MMP インヒビターを用いた癌治療は、明らかな有効性を示す基礎的研究データにも関わらず、最終的には失敗に終わってしまった。その理由として、(1)MMP 分子特異的インヒビターの開発ができなかったこと、(2)標的とする MMP 分子の特定をせずに臨床試験が進められたこと、(3)臨床試験が末期の進行癌患者で進められたこと、(4)MMP の非 ECM 成分に対する活性や生体内での作用に関する情報が充分でなかったこと、(5)MMP インヒビターによる ADAM 分子の活性抑制の重大性が予期できなかったこと、などがあげられる。これらの中でも、特に比較的広域スペクトルの MMP インヒビターを用いて、MMP 分子を特定することなく臨床試験が行われたことは反省すべき点である。Devry ら⁶⁷⁾ は、ファージディスプレイ法を用いて MMP-14 (MT1-MMP) に対するヒト型抗体を開発し、MT1-MMP 活性の特異的阻害により癌細胞の増殖・浸潤・転移と血管新生の有意な抑制を示し、MMP 研究分野ではヒト型抗体を用いた治療法に対して期待が集まっている。MMP に対する広域スペクトル合成インヒビターである BB94 (Batimastat) は、 $IC_{50}=50$ nM 程度で ADAM8 や ADAM19 の活性も阻害する^{68, 69)}。一方、ADAM9 に対する特異的な阻害剤として CGS27023 が報告されている ($K_i=1$ nM)⁷⁰⁾。Asakura ら⁴⁾ は、2,000 個以上のメタロプロテアーゼ阻害剤から ADAM12 活性に対する阻害剤 (KB-R7785) を開発した ($IC_{50}=0.23$ μ M)。本インヒビターは、1 μ M の濃度で ADAM28 酵素活性も阻害する^{20, 40)}。GI254023X は、ADAM17 よりも ADAM10 に対して 100 倍以上強い阻害活性を持つことが報告されており⁷¹⁾、INCB3619 は ADAM9 や ADAM33 よりも ADAM10 と ADAM17 に対して約 300 倍強い阻害活性を示すことが知られている⁷²⁾。しかし、特定の ADAM 分子の活性を特異的に阻害する合成ペプチドインヒビターの開発には限界があると思われる。

ADAM28 の発現や活性抑制により肺癌や乳癌細胞の増殖・転移が抑制されることは実験的には明らかなことから²⁰⁾ (論文投稿準備中)、ADAM28 を標的とした乳癌や肺癌の治療が今後期待される (図 4)。しかし、MMP インヒビターを用いた臨床試験の失敗経験を踏まえて、ADAM28 分子特異的インヒビターの開発とともにその分子作用機構の詳細な検討が臨床試験を進める上で必須である。

おわりに

ADAM28 の性質とヒト癌における重要性について概説

してきた。ADAM28は、ヒトADAM遺伝子ファミリー分子の中でも癌細胞の増殖・浸潤・転移に最も深く関与する分子の一つである。しかし、ADAM28の癌細胞選択的な発現、遺伝子発現調節、活性化などの分子メカニズムについては未解決な部分が多く残されている。また、ADAM28の基質や結合タンパク質についての情報も限られており、プロテオーム解析技術を駆使した検討が待たれる。ADAM28特異的インヒビターの開発やADAM28を標的としたイメージングや治療薬の開発を進める一方で、ADAM28の生理的組織での機能の解明もADAM28分子標的治療法開発に際して重要である。

文 献

- Primakoff, P., Hyatt, H., & Tredick-Kline, J. (1987) *J. Cell Biol.*, **104**, 141-149.
- Blobel, C.P. & White, J.M. (1992) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **4**, 760-776.
- Peschon, J.J., Slack, J.L., Reddy, P., Stocking, K.L., Sunnarborg, S.W., Lee, D.C., Russell, W.E., Castner, B.J., Johnson, R.S., Fitzner, J.N., Boyce, R.W., Nelson, N., Kozlosky, C.J., Wolfson, M.F., Rauch, C.T., Cerretti, D.P., Paxton, R.J., March, C.J., & Black, R.A. (1998) *Science*, **282**, 1281-1284.
- Asakura, M., Kitakaze, M., Takashima, S., Liao, Y., Ishikura, F., Yoshinaka, T., Ohmoto, H., Node, K., Yoshino, K., Ishiguro, H., Asanuma, H., Sanada, S., Matsumura, Y., Takeda, H., Beppu, S., Tada, M., Hori, M., & Higashiyama, S. (2002) *Nat. Med.*, **8**, 35-40.
- Mochizuki, S. & Okada, Y. (2007) *Cancer Sci.*, **98**, 621-628.
- Murphy, G. (2008) *Nat. Rev. Cancer*, **8**, 929-941.
- Bernstein, H.G., Bukowska, A., Krell, D., Bogerts, B., An-sorge, S., & Lendekel, U. (2003) *J. Neurocytol.*, **32**, 153-160.
- Fukata, Y., Lovero, K.L., Iwanaga, T., Watanabe, A., Yokoi, N., Tabuchi, K., Shigemoto, R., Nicoll, R.A., & Fukata, M. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 3799-3804.
- Edwards, D.R., Handsley, M.M., & Pennington, C.J. (2008) *Mol. Aspects Med.*, **29**, 258-289.
- Sahin, U., Weskamp, G., Kelly, K., Zhou, H.M., Higashiyama, S., Peschon, J., Hartmann, D., Saftig, P., & Blobel, C.P. (2004) *J. Cell Biol.*, **164**, 769-779.
- Huovila, A.P., Turner, A.J., Peltto-Huikko, M., Karkkainen, I., & Ortiz, R.M. (2005) *Trends Biochem. Sci.*, **30**, 413-422.
- Wakatsuki, S., Kurisaki, T., & Sehara-Fujisawa, A. (2004) *J. Neurochem.*, **89**, 119-123.
- Verbisck, N.V., Costa, E.T., Costa, F.F., Cavalher, F.P., Costa, M.D., Muras, A., Paixao, V.A., Moura, R., Granato, M.F., Ierardi, D.F., Machado, T., Melo, F., Ribeiro, K.B., Cunha, I.W., Lima, V.C., Maciel Mdo, S., Carvalho, A.L., Soares, F.F., Zanata, S., Sogayar, M.C., Chammas, R., & Camargo, A.A. (2009) *Cancer Res.*, **69**, 5546-5552.
- Emi, M., Katagiri, T., Harada, Y., Saito, H., Inazawa, J., Ito, I., Kasumi, F., & Nakamura, Y. (1993) *Nat. Genet.*, **5**, 151-157.
- Roberts, C.M., Tani, P.H., Bridges, L.C., Laszik, Z., & Bowditch, R.D. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 29251-29259.
- Howard, L., Maciewicz, R.A., & Blobel, C.P. (2000) *Biochem. J.*, **348**, 21-27.
- Massova, I., Kotra, L.P., Fridman, R., & Mobashery, S. (1998) *FASEB J.*, **12**, 1075-1095.
- Takeda, S., Igarashi, T., Mori, H., & Araki, S. (2006) *EMBO J.*, **25**, 2388-2396.
- Schwettmann, L., Wehmeier, M., Jokovic, D., Aleksandrova, K., Brand, K., Manns, M.P., Lichtinghagen, R., & Bahr, M.J. (2008) *J. Hepatol.*, **49**, 243-250.
- Mitsui, Y., Mochizuki, S., Kodama, T., Shimoda, M., Ohtsuka, T., Shiomi, T., Chijiwa, M., Ikeda, T., Kitajima, M., & Okada, Y. (2006) *Cancer Res.*, **66**, 9913-9920.
- Ohtsuka, T., Shiomi, T., Shimoda, M., Kodama, T., Amour, A., Murphy, G., Ohuchi, E., Kobayashi, K., & Okada, Y. (2006) *Int. J. Cancer*, **118**, 263-273.
- Wright, C.M., Larsen, J.E., Hayward, N.K., Martins, M.U., Tan, M.E., Davidson, M.R., Savarimuthu, S.M., McLachlan, R. E., Passmore, L.H., Windsor, M.N., Clarke, B.E., Duhig, E.E., Yang, I.A., Bowman, R.V., & Fong, K.M. (2010) *Genes Chromosomes Cancer*, **49**, 688-698.
- Stokes, A., Joutsa, J., Ala-Aho, R., Pitchers, M., Pennington, C.J., Martin, C., Premachandra, D.J., Okada, Y., Peltonen, J., Grenman, R., James, H.A., Edwards, D.R., & Kahari, V.M. (2010) *Clin. Cancer Res.*, **16**, 2022-2035.
- Roemer, A., Schwettmann, L., Jung, M., Roigas, J., Kristiansen, G., Schnorr, D., Loening, S.A., Jung, K., & Lichtinghagen, R. (2004) *Oncol. Rep.*, **11**, 529-536.
- Matsuura, S., Oda, Y., Matono, H., Izumi, T., Yamamoto, H., Tamiya, S., Iwamoto, Y., & Tsuneyoshi, M. (2010) *Hum. Pathol.*, **41**, 343-351.
- Kim, I.M., Ramakrishna, S., Gusarova, G.A., Yoder, H.M., Costa, R.H., & Kalinichenko, V.V. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 22278-22286.
- Schlomann, U., Rathke-Hartlieb, S., Yamamoto, S., Jockusch, H., & Bartsch, J.W. (2000) *J. Neurosci.*, **20**, 7964-7971.
- Sung, S.Y., Kubo, H., Shigemura, K., Arnold, R.S., Logani, S., Wang, R., Konaka, H., Nakagawa, M., Mousses, S., Amin, M., Anderson, C., Johnstone, P., Petros, J.A., Marshall, F.F., Zhau, H.E., & Chung, L.W. (2006) *Cancer Res.*, **66**, 9519-9526.
- Le Pabic, H., Bonnier, D., Wewer, U.M., Coutand, A., Musso, O., Baffet, G., Clement, B., & Theret, N. (2003) *Hepatology*, **37**, 1056-1066.
- Okada, A., Mochizuki, S., Yatabe, T., Kimura, T., Shiomi, T., Fujita, Y., Matsumoto, H., Sehara-Fujisawa, A., Iwamoto, Y., & Okada, Y. (2008) *Arthritis Rheum.*, **58**, 778-789.
- Worley, J.R., Baugh, M.D., Hughes, D.A., Edwards, D.R., Hogan, A., Sampson, M.J., & Gavrilovic, J. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 51340-51346.
- Worley, J.R., Hughes, D.A., Dozio, N., Gavrilovic, J., & Sampson, M.J. (2007) *Cardiovasc. Diabetol.*, **6**, 21.
- Hikichi, Y., Yoshimura, K., & Takigawa, M. (2009) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **386**, 294-299.
- Howard, L., Zheng, Y., Horrocks, M., Maciewicz, R.A., & Blobel, C. (2001) *FEBS Lett.*, **498**, 82-86.
- Delespesse, G., Sarfati, M., Wu, C.Y., Fournier, S., & Letellier, M. (1992) *Immunol. Rev.*, **125**, 77-97.
- Bonnefoy, J.Y., Plater-Zyberk, C., Lecoanet-Henchoz, S., Gauchat, J.F., Aubry, J.P., & Graber, P. (1996) *Immunol. Today*, **17**, 418-420.
- Fourie, A.M., Coles, F., Moreno, V., & Karlsson, L. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 30469-30477.
- Hwa, V., Oh, Y., & Rosenfeld, R.G. (1999) *Endocr. Rev.*, **20**, 761-787.
- Bunn, R.C. & Fowlkes, J.L. (2003) *Trends Endocrinol. Metab.*, **14**, 176-181.

- 40) Mochizuki, S., Shimoda, M., Shiomi, T., Fujii, Y., & Okada, Y. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **315**, 79–84.
- 41) Fowlkes, J.L., Enghild, J.J., Suzuki, K., & Nagase, H. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 25742–25746.
- 42) Miyamoto, S., Yano, K., Sugimoto, S., Ishii, G., Hasebe, T., Endoh, Y., Kodama, K., Goya, M., Chiba, T., & Ochiai, A. (2004) *Cancer Res.*, **64**, 665–671.
- 43) Manes, S., Llorente, M., Lacalle, R.A., Gomez-Mouton, C., Kremer, L., Mira, E., & Martinez, A.C. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 6935–6945.
- 44) Sadowski, T., Dietrich, S., Koschinsky, F., & Sedlacek, R. (2003) *Mol. Biol. Cell.*, **14**, 4569–4580.
- 45) Loechel, F., Fox, J.W., Murphy, G., Albrechtsen, R., & Wewer, U.M. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **278**, 511–515.
- 46) Okada, Y. (2009) Proteinases and matrix degradation. in *Kelley's Textbook of Rheumatology* (Harris, E.D., J., Budd, R. C., Genovese, M.C., Firestein, G.S., & Sargent, J.S. eds.), 8th edition, pp. 115–134, Elsevier Saunders, Philadelphia.
- 47) Zeng, W., Corcoran, C., Collins-Racie, L.A., Lavallie, E.R., Morris, E.A., & Flannery, C.R. (2006) *Biochim. Biophys. Acta*, **1760**, 517–524.
- 48) Silver, D.L., Hou, L., Somerville, R., Young, M.E., Apte, S.S., & Pavan, W.J. (2008) *PLoS Genet.*, **4**, e1000003.
- 49) Thomas, G.M., Panicot-Dubois, L., Lacroix, R., Dignat-George, F., Lombardo, D., & Dubois, C. (2009) *J. Exp. Med.*, **206**, 1913–1927.
- 50) Dimitroff, C.J., Descheny, L., Trujillo, N., Kim, R., Nguyen, V., Huang, W., Pienta, K.J., Kutok, J.L., & Rubin, M.A. (2005) *Cancer Res.*, **65**, 5750–5760.
- 51) Shimoda, M., Hashimoto, G., Mochizuki, S., Ikeda, E., Nagai, N., Ishida, S., & Okada, Y. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 25864–25874.
- 52) Bridges, L.C. & Bowditch, R.D. (2005) *Curr. Pharm. Des.*, **11**, 837–847.
- 53) Bridges, L.C., Hanson, K.R., Tani, P.H., Mather, T., & Bowditch, R.D. (2003) *Biochemistry*, **42**, 3734–3741.
- 54) Eto, K., Huet, C., Tarui, T., Kupriyanov, S., Liu, H. Z., Puzon-McLaughlin, W., Zhang, X.P., Sheppard, D., Engvall, E., & Takada, Y. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 17804–17810.
- 55) Hall, T., Leone, J.W., Wiese, J.F., Griggs, D.W., Pegg, L.E., Pauley, A.M., Tomasselli, A.G., & Zack, M.D. (2009) *Biosci. Rep.*, **29**, 217–228.
- 56) Loechel, F., Gilpin, B.J., Engvall, E., Albrechtsen, R., & Wewer, U.M. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 16993–16997.
- 57) Nishi, E., Hiraoka, Y., Yoshida, K., Okawa, K., & Kita, T. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 31164–31172.
- 58) Nehring, L.C., Miyamoto, A., Hein, P.W., Weinmaster, G., & Shipley, J.M. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 20349–20355.
- 59) Gomez, D.E., Alonso, D.F., Yoshiji, H., & Thorgeirsson, U.P. (1997) *Eur. J. Cell. Biol.*, **74**, 111–122.
- 60) Brew, K., Dinakarpandian, D., & Nagase, H. (2000) *Biochim. Biophys. Acta*, **1477**, 267–283.
- 61) Oh, J., Takahashi, R., Kondo, S., Mizoguchi, A., Adachi, E., Sasahara, R.M., Nishimura, S., Imamura, Y., Kitayama, H., Alexander, D.B., Ide, C., Horan, T.P., Arakawa, T., Yoshida, H., Nishikawa, S., Itoh, Y., Seiki, M., Itohara, S., Takahashi, C., & Noda, M. (2001) *Cell*, **14**, 789–800.
- 62) Muraguchi, T., Takegami, Y., Ohtsuka, T., Kitajima, S., Chandana, E.P., Omura, A., Miki, T., Takahashi, R., Matsumoto, N., Ludwig, A., Noda, M., & Takahashi, C. (2007) *Nat. Neurosci.*, **10**, 838–845.
- 63) Terraube, V., Marx, I., & Denis, C.V. (2007) *Thromb. Res.*, **120**, S64–70.
- 64) Terraube, V., Pendu, R., Baruch, D., Gebbink, M.F., Meyer, D., Lenting, P.J., & Denis, C.V. (2006) *J. Thromb. Haemost.*, **4**, 519–526.
- 65) Koo, B.H., Oh, D., Chung, S.Y., Kim, N.K., Park, S., Jang, Y., & Chung, K. H. (2002) *Thromb. Res.*, **105**, 471–476.
- 66) Kuroda, H., Mochizuki, S., Shimoda, M., Chijiwa, M., Kamiya, K., Izumi, Y., Watanabe, M., Horinouchi, H., Kawamura, M., Kobayashi, K., & Okada, Y. (2010) *Int. J. Cancer.*, **127**, 1844–1856.
- 67) Devy, L., Huang, L., Naa, L., Yanamandra, N., Pieters, H., Frans, N., Chang, E., Tao, Q., Vanhove, M., Lejeune, A., van Gool, R., Sexton, D. J., Kuang, G., Rank, D., Hogan, S., Pazmany, C., Ma, Y.L., Schoonbroodt, S., Nixon, A.E., Ladner, R. C., Hoet, R., Henderikx, P., Tenhoo, C., Rabbani, S.A., Valentino, M.L., Wood, C.R., & Dransfield, D.T. (2009) *Cancer Res.*, **69**, 1517–1526.
- 68) Schlomann, U., Wildeboer, D., Webster, A., Antropova, O., Zeuschner, D., Knight, C.G., Docherty, A. J., Lambert, M., Skelton, L., Jockusch, H., & Bartsch, J.W. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 48210–48219.
- 69) Chesneau, V., Becherer, J.D., Zheng, Y., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Blobel, C.P. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 22331–22340.
- 70) Roghani, M., Becherer, J.D., Moss, M.L., Atherton, R.E., Erdjument-Bromage, H., Arribas, J., Blackburn, R.K., Weskamp, G., Tempst, P., & Blobel, C.P. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 3531–3540.
- 71) Ludwig, A., Hundhausen, C., Lambert, M.H., Broadway, N., Andrews, R.C., Bickett, D.M., Leesnitzer, M.A., & Becherer, J. D. (2005) *Comb. Chem. High Throughput Screen*, **8**, 161–171.
- 72) Zhou, B.B., Peyton, M., He, B., Liu, C., Girard, L., Caudler, E., Lo, Y., Baribaud, F., Mikami, I., Reguart, N., Yang, G., Li, Y., Yao, W., Vaddi, K., Gazdar, A.F., Friedman, S.M., Jablons, D.M., Newton, R.C., Fridman, J.S., Minna, J.D., & Scherle, P. A. (2006) *Cancer Cell*, **10**, 39–50.