

特集：次世代シグナル伝達研究—先駆的基礎解析と臨床・創薬への展開—

チロシンキナーゼ型受容体のセリン／トレオニンリン酸化制御

周 越, 田 中 智 大, 櫻 井 宏 明

EGFR (epidermal growth factor receptor) などのチロシンキナーゼ型受容体 (RTK: receptor tyrosine kinase) は, リガンド結合により細胞内のチロシンキナーゼの活性化が起こり, チロシン自己リン酸化を介して細胞内にシグナルを伝える. 筆者らは, 炎症性サイトカイン TNF- α (tumor necrosis factor- α) によって EGFR のセリン／トレオニン残基がリン酸化されることを見いだした. そのリン酸化には EGFR チロシンキナーゼ活性が関与しておらず, MAPK (mitogen-activated protein kinase) を介したフィードバック機構であることがわかった. 本稿では, EGFR のセリン／トレオニンリン酸化のシグナル伝達機構や生理機能について概説するとともに, がん分子標的薬に対する獲得耐性機構など, RTK のセリン／トレオニンリン酸化制御機構の重要性を紹介する.

1. はじめに

プロテインキナーゼは, 一部の例外を除いてセリン／トレオニンキナーゼとチロシンキナーゼに大別される. さらに, チロシンキナーゼは EGFR (epidermal growth factor receptor) などの受容体型チロシンキナーゼ (receptor tyrosine kinase: RTK) と, Src などの細胞質チロシンキナーゼに分けられる. 興味深いことに, チロシンキナーゼは酵母ゲノムにはコードされておらず, おそらく多細胞生物における細胞機能や細胞間コミュニケーションに重要な役割を果たしていると考えられる¹⁾. 実際, チロシンキナーゼは細胞の分化や増殖に重要な役割を果たしていることが明らかにされるとともに, がん細胞において過剰発現や活性化変異が報告されるなど, がん遺伝子としてもその機能が精力的に解析されてきた. RTK の基本的な情報変換機構の解析は, シグナル伝達研究の黎明期から行われ, その基本骨

格が確立されている. つまり, 細胞外ドメインにリガンドが結合することにより立体構造が変化し, 細胞内のチロシンキナーゼドメインの活性化, それに続いてチロシン残基の自己リン酸化が起こり, さらにリン酸化されたチロシン残基を認識するアダプター分子等を介して細胞内にシグナルが伝えられるというものである. このように, 「RTK 活性化=チロシン自己リン酸化」と単純化して捉えられているものの, RTK 活性調節機構には依然として未解明な点が多く残されているのが現状である.

我々は, TAK1 (transforming growth factor- β -activated kinase 1) が NF- κ B (nuclear factor- κ B) を活性化するなど, TNF- α (tumor necrosis factor- α) シグナル伝達系の研究を進めてきた²⁻⁴⁾. 一連の研究を進める中で, 意外なことに炎症シグナルが MAPK (mitogen-activated protein kinase) を介して EGFR の活性化を制御していること, しかもそれがチロシン残基ではなくセリン／トレオニン残基のリン酸化で制御されていることを見いだした. これらの事実は, RTK のセリン／トレオニンリン酸化の重要性を示唆するものであり, チロシンキナーゼであるが故に見落とされてきた新たな RTK 制御系の存在を示すものである. そこで, 本稿では EGFR のセリン／トレオニンリン酸化に関する我々の研究成果を中心に解説するとともに, がん分子標的薬に対する獲得耐性機構における RTK のセリン／トレオニンリン酸化制御機構の重要性についても言及したい.

富山大学大学院医学薬学研究部 (薬学) がん細胞生物学研究室 (〒930-0194 富山市杉谷 2630 番地)

Regulation of receptor tyrosine kinases by Ser/Thr phosphorylation

Yue Zhou, Tomohiro Tanaka, and Hiroaki Sakurai (Department of Cancer Cell Biology, Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Toyama, 2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan)

2. チロシンキナーゼに依存した ErbB 受容体の活性化機構

EGFR (別名 ErbB1) は, ErbB2, ErbB3, および ErbB4 とともに ErbB 受容体ファミリーを構成している⁵⁻¹⁰⁾. 各 ErbB 受容体には複数のリガンドがあるが, ErbB2 のリガンドは見つかっていない. また, ErbB3 は ATP 結合部位のリシン残基が変異しており, チロシンキナーゼ活性を持たないと考えられている. ErbB 受容体ファミリーの構造はいずれも共通しており, N 末端側からリガンド結合や二量体形成に必須の細胞外ドメイン, 膜貫通ドメイン, 細胞内には膜近傍ドメイン, チロシンキナーゼドメイン, そして C 末端自己リン酸化ドメインから構成されている (図 1). リガンドが結合すると構造が変化し, ホモまたはヘテロ二量体を形成する. それに伴い, 細胞内チロシンキナーゼの活性化と C 末端のチロシン残基の自己リン酸化が引き起こされ, 様々な生理機能を調節する. 同じ ErbB 受容体であっても, 結合するリガンドの違いや二量体化する受容体の組み合わせによって下流のシグナルが異なることが報告されている.

ErbB 受容体ファミリーの中で最も研究が進んでいる EGFR には, EGFR だけに結合する EGF, TGF- α (transforming growth factor- α), および AR (amphiregulin), また EGFR と ErbB4 の両方に結合する HB-EGF (heparin-binding EGF), BTC (betacellulin), EREG (epiregulin) などのリガンドがある. これらのリガンドが EGFR に結合すると, 主に EGFR のホモ二量体が形成され, チロシンキナーゼ

活性を介して下流の Ras/Raf/MAPK, PI3K/Akt や STAT3 などのシグナルなどが活性化される. 非小細胞肺癌や神経膠芽腫においては, チロシンキナーゼドメインや細胞外ドメインの変異によって恒常的に EGFR が活性化されている. 現在, ゲフィチニブやエルロチニブなどのチロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI) やセツキシマブなどの抗 EGFR 中和抗体が, がん分子標的薬として臨床応用されている (図 1)¹¹⁻¹⁴⁾.

3. 炎症シグナルによる EGFR 制御の分子機構

1) TNF- α による疾患発症における EGFR の役割

TNF- α は炎症を誘発することでマクロファージなどから産生され, 感染防御などの生体内の恒常性維持に必須なサイトカインである. 関節リウマチなどの自己免疫疾患の病態形成に関与しており, 関節滑膜増生や骨破壊を引き起こすことから, その中和抗体などが臨床応用されている¹⁵⁾. 最近, 関節リウマチ患者や関節炎モデルの滑膜組織で EGFR 発現が亢進していること, EGFR-TKI が関節病変を著明に改善することが報告された¹⁶⁾. 一方, がん微小環境においても, TNF- α はがん細胞の増殖や浸潤・転移, さらに腫瘍血管新生を誘導するなど, がん悪性化進展因子としての役割が注目されている¹⁷⁾. したがって, 慢性的な炎症反応を伴う病変部位においては, EGFR シグナルと TNF- α シグナルのクロストークが病態形成に重要な役割を果たしている可能性が考えられる.

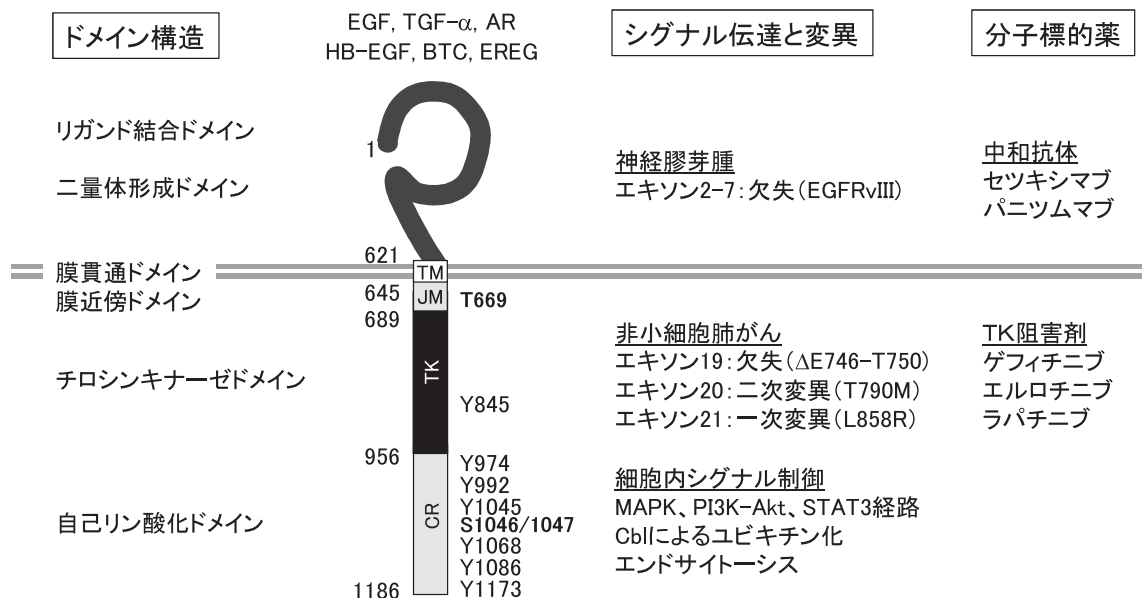


図1 EGFRの構造・機能とがん分子標的治療

EGFRのドメイン構造, シグナル伝達とヒトがん細胞における遺伝子変異, さらに開発された分子標的薬を示している. 669番目のトレオニン残基と1046/1047番目のセリン残基がMAPKを介してリン酸化される.

2) チロシンキナーゼ非依存的なセリン／トレオニンリン酸化

TGF- α や HB-EGF などの EGFR リガンドは膜結合型として発現しており，G タンパク質共役受容体 (G-protein-coupled receptor: GPCR) やインテグリンなどの刺激に伴い ADAM プロテアーゼ等で切断され遊離型リガンドとして機能する。遊離したリガンドがオートクライン機構で EGFR を活性化する，いわゆるトランス活性化機構の存在が知られている¹⁸⁾。TNF- α もこの機構を活性化することが報告されているが^{19~21)}，炎症シグナルにおける役割はほとんど知られていない。このトランス活性化経路は，通常のリガンド刺激と同様に EGFR チロシンキナーゼ活性に依存しており，MAPK 活性化などの下流シグナルは EGFR-TKI で阻害することができる。

筆者らは，HeLa 細胞を用いて TNF- α によるトランス活性化機構の解析を試みる過程で，チロシンキナーゼ活性に全く依存しない新しい EGFR リン酸化経路が存在することを見いだした²²⁾。293 細胞の過剰発現系を用いてリン酸化されるアミノ酸残基を同定した結果，興味深いことにチロシン残基ではなく，膜近傍ドメインの Thr-669 と C 末端自己リン酸化ドメインの Ser-1046 と Ser-1047 がリン酸化

されることがわかった²³⁾。また，これらセリン／トレオニン残基のリン酸化は，肺がん細胞株 A549 をはじめ他の多くのがん細胞株で観察されるとともに，高浸透圧などの他の細胞ストレスによっても誘導された。

TNF- α による EGFR のリン酸化はセリン／トレオニン残基に起こり，予想通り EGFR-TKI や ADAM 阻害剤によって全く阻害されなかったことから，EGFR のトランス活性化とは異なった機構で起こっていると考えられた。また，TNF- α の下流シグナルも EGFR-TKI で阻害されなかったことから，EGFR のトランス活性化と異なる機構の存在が示唆された。一方，TNF- α シグナルを司る TAK1 の阻害剤が，EGFR リン酸化を完全に抑制した。さらに，TAK1 の下流シグナルを解析した結果，MEK-ERK を介して Thr-669 が，p38 を介して Ser-1046/1047 がリン酸化されていた (図 2)。以上の結果は，チロシンキナーゼ活性に依存しない EGFR の機能を示している。

3) p38 を介したエンドサイトーシス

リガンドによって活性化された EGFR は，クラスリン依存的または非依存的にエンドサイトーシス機構により細胞内に移行することが知られている²⁴⁾。EGFR が初期エン

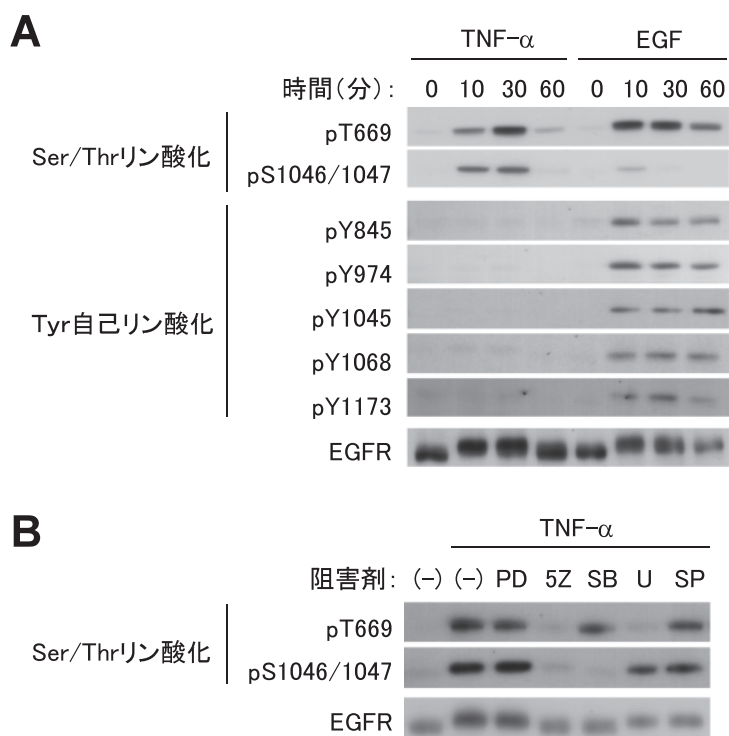


図2 TNF- α による EGFR のエンドサイトーシス

(A) HeLa 細胞を TNF- α または EGF で刺激したときの EGFR リン酸化の経時変化，(B) TNF- α による EGFR の Thr-669 および Ser-1046/1047 のリン酸化に対する阻害剤の効果，PD: PD153035 (EGFR チロシンキナーゼ阻害剤)，5Z: 5Z-7-oxozeaenol (TAK1 阻害剤)，SB: SB203580 (p38 阻害剤)，U: U0126 (MEK 阻害剤)，SP: SP600125 (JNK 阻害剤)。

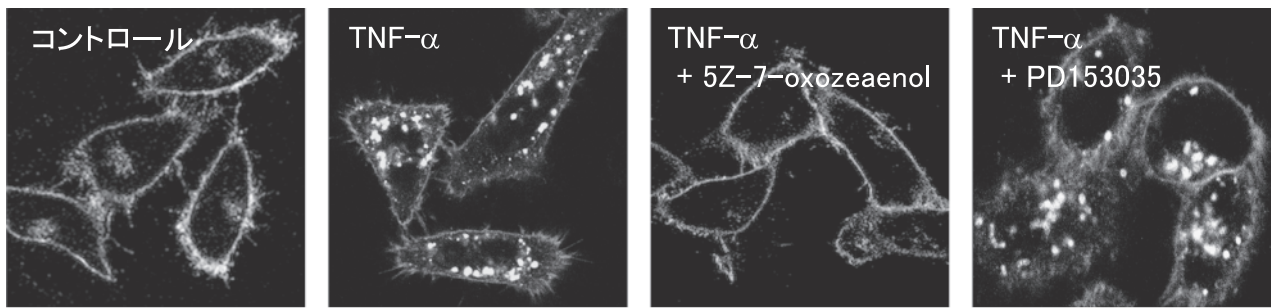
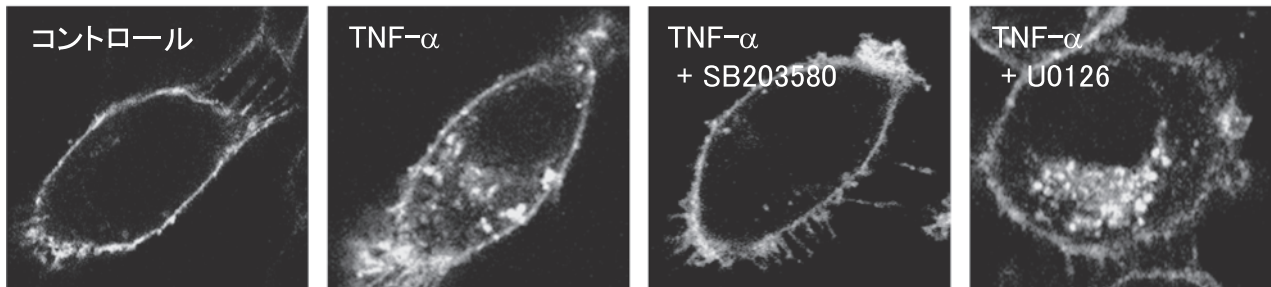
A**B**

図3 TNF- α によるEGFRのエンドサイトーシス

C末端にGFPを融合したEGFRを安定発現するHeLa細胞を、TNF- α で15分間刺激した。5Z-7-oxozeaenol：TAK1阻害剤、PD153035：EGFRチロシンキナーゼ阻害剤、SB203580：p38阻害剤、U0126：MEK阻害剤。

ドソームに存在する間も活性化しているため、細胞内シグナルを持続的に伝える正の制御である。その後、活性化したEGFRは、一部は脱リン酸化され細胞膜へリサイクルされるものの、その多くは後期エンドソームからリソソームに運ばれて分解される。

上記のごとく、TNF- α 刺激によりEGFRのセリン／トレオニン残基がリン酸化されると、驚くべきことにリガンド刺激の場合と同様にEGFRのエンドサイトーシスが誘導された^{22, 23, 25)}。リン酸化と同様に、TNF- α によるエンドサイトーシスもEGFR-TKIでは抑制されず、TAK1阻害剤で抑制された。p38阻害剤によっても抑えられたことから、TAK1→p38を介したSer-1046/1047リン酸化がエンドサイトーシスを制御していると考えられた(図3)。また、クラスリン重鎖(clathrin heavy chain)のノックダウンで抑制されたことから、クラスリン依存性エンドサイトーシスであると考えられた。さらに、リガンド添加時と異なり細胞内に移行したEGFRはほとんど分解されず、p38の不活性化に伴い脱リン酸化され細胞膜にリサイクルされた。このように、TNF- α はp38を介してEGFRのクラスリン依存的なエンドサイトーシスを誘導し、その制御はリガンド誘導性のものとは異なり、EGFRチロシンキナーゼ活性には依存しない、新しい制御機構を介することがわかった。

4) セリン／トレオニンリン酸化の生理機能

TNF- α 刺激など細胞ストレス負荷時になぜEGFRがリン酸化され、エンドサイトーシスするのだろうか？ おそらく細胞のストレス回避反応ではないかと考え、アポトーシスとの関係について調べた。siRNAを用いてEGFRをノックダウンしたところ、TNF- α によりCaspase-3の活性化などアポトーシス経路の活性化が認められた。阻害剤を用いた検討により、TAK1→p38によるEGFRのSer-1046/1047リン酸化を介したシグナルが抗アポトーシス作用に重要であることがわかった。さらに、アポトーシス抑制効果がEGFRの局在と関連があるか、クラスリン重鎖に対するsiRNAを用いて調べたところ、細胞膜上にとどまっている状態であってもアポトーシスの抑制が起きていることがわかった。したがって、EGFRによるアポトーシス抑制は、TNF- α によるEGFRのSer-1046/1047リン酸化そのものが重要であり、EGFRの局在は影響しないことが示された。

TNF- α シグナルにおける抗アポトーシスシグナルとしてTAK1を介したNF- κ B活性化が重要である。そこで、TAK1の下流に位置するEGFR経路とNF- κ B(p65)経路の関係を調べた結果、両経路は完全に独立しており、EGFRノックダウン細胞においてNF- κ Bの活性化は抑制されず、同様にp65ノックダウン細胞においてEGFRリン酸化は抑制されなかった。一方、両者を同時にノックダ

ウンすると、それぞれ単独の場合と比べて著しいアポトーシスの誘導が認められた。

以上の結果から、TAK1はNF- κ B経路に加えてEGFR経路を介してアポトーシスを抑制していると考えられた(図4)。つまり、炎症・ストレス下において細胞がストレ

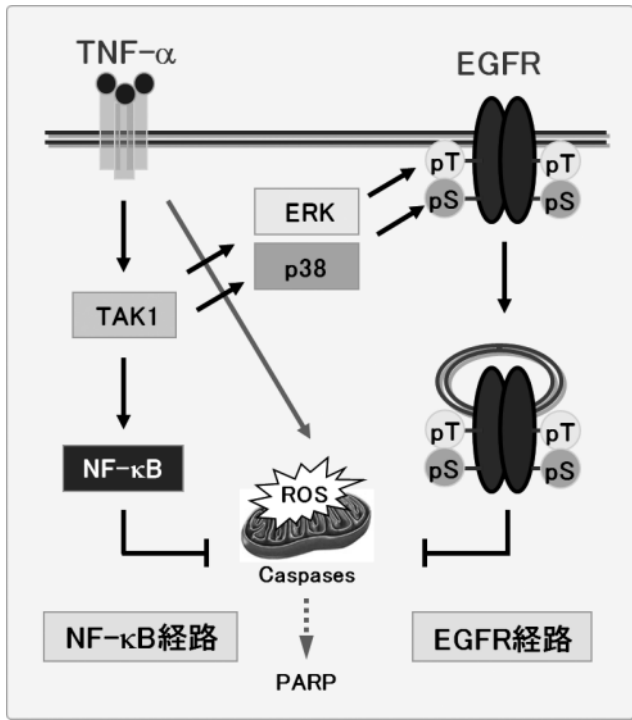


図4 TNF- α によるEGFRの制御機構

TNF- α によって活性化されたTAK1は、下流のERKおよびp38を介してEGFRのそれぞれThr-669およびSer-1046/1047のリン酸化を誘導する。p38-Ser-1046/1047経路は、EGFRのエンドサイトーシスを誘導する。このように、TAK1はNF- κ BとEGFRの二つの独立した抗アポトーシス経路を制御している。

スを感じている間、MAPKを介してEGFRをリン酸化し、エンドサイトーシスにより細胞内に局在化することによって細胞外のリガンドとの接触を物理的に阻害することにより一時的に増殖シグナルを遮断し、さらに細胞内から抗アポトーシスシグナルを送ることによりストレス回避を図っているのではないかと考えられた。TNF- α による生理的な細胞ストレスは一時的であり、刺激後60分にはMAPK活性が定常状態に戻るためEGFRも細胞膜にリサイクルされてくるのに対して、高浸透圧刺激ではストレス回避が難しくMAPKの持続的な活性化が起こりEGFRも細胞内に長くとどまっている。このように、細胞ストレスはEGFRだけでなく他の増殖因子受容体の細胞内局在も変化させている可能性も考えられ、ストレス負荷時のRTK制御の重要性を示唆している。

4. Thr-669リン酸化によるチロシン自己リン酸化抑制

近年、EGFRのX線結晶構造解析によって、キナーゼドメインが非対称性にホモ二量体を形成していることが明らかにされた^{26,27)}。つまり、二つのキナーゼドメインがそれぞれ違う役割を果たしており、片方のキナーゼドメイン(アクチベーター側)のC-Lobeがもう一方のキナーゼドメイン(レシーバー側)のN-Lobeとドッキングして活性化するモデルが提唱されている。また、レシーバー側の膜近傍ドメインが、アクチベーター側のキナーゼドメインのC-Lobeと相互作用することもチロシンキナーゼ活性発現に重要な役割を果たしている²⁸⁻³⁰⁾。Thr-669は膜近傍ドメインに位置していることから、そのリン酸化はチロシンキナーゼ活性にどのような役割を果たしているのだろうか？そこで、EGFRを過剰発現し、恒常的なチロシンリン酸化が起こっているヒト乳がん細胞MDA-MB-468細胞

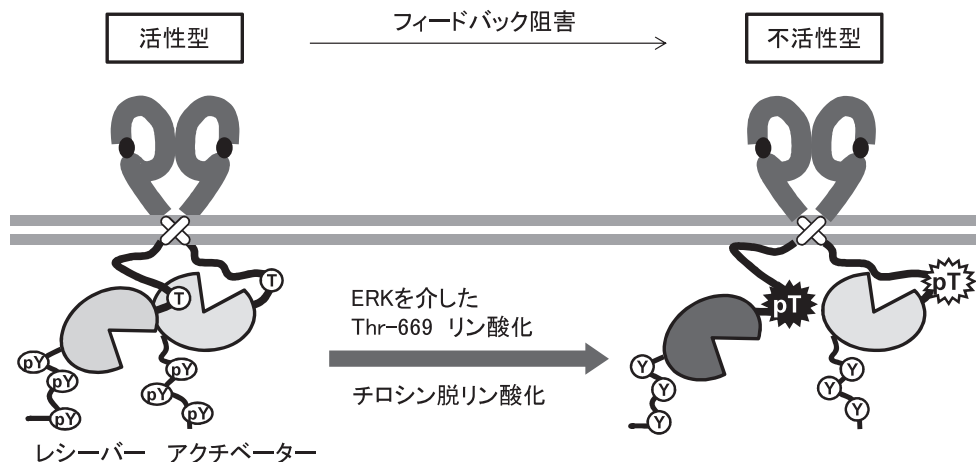


図5 Thr-669リン酸化によるEGFRのフィードバック阻害

EGFRの活性型は、アクチベーター側とレシーバー側のキナーゼドメインが非対称性にホモ二量体を形成している。ERKを介してThr-669のリン酸化が誘導されると、C末端側のチロシン残基が脱リン酸化される。このERKを介するフィードバック阻害機構には、レシーバー側のThr-669のリン酸化が関与している。

を用いて検討した。その結果、リガンドやホルボールエステル刺激によって ERK を介して Thr-669 のリン酸化を誘導すると、チロシン残基の恒常的な自己リン酸化が著明に抑制されることがわかった。このとき、アクチベーターとレシーバーのどちらか、あるいは両方の Thr-669 リン酸化が重要なのかを検討した結果、両者ともリン酸化されるものの、チロシンリン酸化抑制にはレシーバー側の Thr-669 のリン酸化が関与していることがわかった。このように、Thr-669 リン酸化は活性化 EGFR のフィードバック阻害作用に関与していることが示された (図 5)。

5. 他の RTK のセリン／トレオニン残基のリン酸化

EGFR のセリン／トレオニン残基のリン酸化の制御機構の結果から、他の RTK にも同様の制御機構が存在する可能性が考えられた。そこで、まず EGFR と同じファミリーに属する ErbB2 および ErbB3 のリン酸化が起こっているのかを検討した。HeLa 細胞を TNF- α で刺激すると、SDS-PAGE 上でのバンドシフトが観察され、それらはそれぞれ MEK および p38 阻害剤で抑制されたことから (筆者ら、未発表データ)、EGFR だけでなく ErbB2 および ErbB3 も MAPK を介してリン酸化されていることがわかっていて、実際、EGFR の Thr-669 近傍の配列は、他の ErbB メンバーにも高度に保存されている。しかし、チロシンキナーゼ活性を持たない ErbB3 においては Thr-669 に相当するアミノ酸がアスパラギン酸に置換している。ErbB3 は他の ErbB 受容体とヘテロ二量体を形成するが、キナーゼ活性を持たないため二量体のアクチベーター側でのみ機能すると考えられる。したがって、Thr-669 に相当する部位が酸性アミノ酸に置換することにより、常にリン酸化された構造をとってレシーバー側の機能を発揮しないようにしているのかもしれない。今後、炎症シグナルによってリン酸化されるアミノ酸残基の同定、さらにその機能解析を通じて ErbB 受容体のセリン／トレオニンリン酸化の生理機能の解明が必要である。

その他の RTK ファミリーのセリン／トレオニンリン酸化の解析も進みつつある。FGFR1 (fibroblast growth factor receptor 1) の Ser-777 が p38 を介してリン酸化され、それが細胞外にあるリガンド FGF1 の細胞質内や核内への移行に必須であるという報告がある³¹⁾。アニソマイシンや高浸透圧ストレスによって促進されることから、EGFR と同様に p38 による FGFR1 のリン酸化が、リガンド／受容体の細胞内局在を制御していると考えられる。また、RTK の中で最もメンバーの多い Eph ファミリーに属する EphA2 においては、リガンド非依存的に PI3K-Akt 経路を介した Ser-897 リン酸化が遊走・浸潤能に関与していることが報告されている^{32,33)}。本受容体は、神経膠芽腫などのがん患者の予後と正の相関があるが、EphrinA1 などのリ

ガンドが腫瘍内ではほとんど発現しておらず、リガンド非依存的な機能が注目されていた。したがって、Ser-897 のリン酸化がチロシンキナーゼ非依存的な EphA2 の機能として転移などのがん悪性化に関与しているのではないかと考えられている。

6. がん分子標的薬に対する獲得耐性における RTK のリン酸化

RTK などのプロテインキナーゼを阻害するがん分子標的治療薬の開発が進んでいるが、同時にその獲得耐性が臨床問題となっている。例えば、BRAF-V600E 変異を有するメラノーマ (詳細は横山および矢野の稿を参照) や大腸がんの治療薬としてベムラフェニブなどが開発されているが、その耐性機構として EGFR をはじめとする RTK の代償的な活性化が起こっていることが報告されている^{34,35)}。これは、恒常的な BRAF 活性が起こっている細胞では、ERK 活性化を介して増殖・生存シグナルが亢進しているが、同時に細胞表面上に発現する多くの RTK がフィードバック阻害を受けているため、BRAF 阻害によりフィードバック機構が解除され RTK の再活性化を起こすと考えられている。EGFR の Thr-669 リン酸化がフィードバック阻害機構に関わることを示したように、今後他の RTK のフィードバック阻害機構におけるセリン／トレオニンのリン酸化の果たす役割が注目される。実際、EGFR と ErbB2 を過剰発現する乳がん細胞 SKBR3 に EGFR/ErbB2 阻害剤ラパチニブを処理すると、チロシンリン酸化が抑制されるのとは逆に、ErbB2 の C 末端のセリン残基のリン酸化が顕著に亢進することが報告されている³⁶⁾。このように、ErbB 受容体ではチロシンリン酸化とセリン／トレオニンリン酸化が逆相関していると考えられるが、これはフィードバック阻害機構が関与していると考えられる。

7. お わ り に

RTK の活性化機構の研究は、シグナル伝達研究の歴史と言っても過言ではなく、その研究成果は他のシグナル伝達系の研究を牽引し、さらにがん分子標的薬の開発にも応用されてきた。このように、基礎から臨床・創薬へと発展してきた RTK 研究であるにもかかわらず、本稿で紹介したようなセリン／トレオニンリン酸化による制御機構については未解明な点が多く残されている。近年のリン酸化プロテオミクス研究技術の発展により、RTK のセリン／トレオニン残基のリン酸化情報がデータベース上には数多く収載されている。したがって、RTK のセリン／トレオニンリン酸化研究は、古くて新しい次世代シグナル伝達研究として今後重要な位置を占めるのではないかと考えられ、がん分子標的薬の耐性克服に向けた戦略構築に向けた情報提供にも期待がかかる。

文 献

- 1) Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., & Sudarsanam, S. (2002) *Science*, **298**, 1912–1934.
- 2) Sakurai, H. (2012) *Trends Pharmacol. Sci.*, **33**, 522–530.
- 3) Sakurai, H., Miyoshi, H., Toriumi, W., & Sugita, T. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 10641–10648.
- 4) Sakurai, H., Chiba, H., Miyoshi, H., Sugita, T., & Toriumi, W. (1999) *J. Biol. Chem.*, **276**, 30353–30356.
- 5) Sebastian, S., Settleman, J., Reshki, S.J., Azzariti, A., Bellizzi, A., & Paradiso, A. (2006) *Biochim. Biophys. Acta*, **1766**, 120–139.
- 6) Schneider, M.R. & Wolf, E. (2009) *J. Cell Physiol.*, **218**, 460–466.
- 7) Sebastian, S., Settleman, J., Reshki, S.J., Azzariti, A., Bellizzi, A., & Paradiso, A. (2006) *Biochim. Biophys. Acta*, **1766**, 120–139.
- 8) Singh, A.B. & Harris, R.C. (2005) *Cell Signal.*, **17**, 1183–1193.
- 9) Sorkin, A. & Goh, L.K. (2008) *Exp. Cell Res.*, **314**, 3093–3106.
- 10) Avraham, R. & Yarden, Y. (2011) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **12**, 104–117.
- 11) Lynch, T.J., Bell, D.W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R.A., Brannigan, B.W., Harris, P.L., Haserlat, S.M., Supko, J.G., Haluska, F.G., Louis, D.N., Christiani, D.C., Settleman, J., & Haber, D.A. (2004) *N. Engl. J. Med.*, **350**, 2129–2139.
- 12) Paez, J., Jänne, P., Lee, J., Tracy, S., Greulich, H., Gabriel, S., Herman, P., Kaye, F., Lindeman, N., Boggon, T., Naoki, K., Sasaki, H., Fujii, Y., Eck, M., Sellers, W., Johnson, B., & Meyerson, M. (2004) *Science*, **304**, 1497–1500.
- 13) Sharma, S.V., Bell, D.W., Settleman, J., & Haber, D.A. (2007) *Nat. Rev. Cancer*, **7**, 169–181.
- 14) Zhang, H., Berezov, A., Wang, Q., Zhang, G., Drebin, J., Murali, R., & Greene, M.I. (2007) *J. Clin. Invest.*, **117**, 2051–2058.
- 15) Moots, R.J. & Naisbett-Groet, B. (2012) *Rheumatology*, **51**, 2252–2261.
- 16) Swanson, C.D., Akama-Garren, E.H., Stein, E.A., Petralia, J.D., Ruiz, P.J., Edalati, A., Lindstrom, T.M., Robinson, W.H. (2012) *J. Immunol.*, **188**, 3513–3521.
- 17) Balkwill, F. (2009) *Nat. Rev. Cancer*, **9**, 361–371.
- 18) Ohtsu, H., Dempsey, P.J., & Eguchi, S. (2006) *Am. J. Physiol.*, **291**, C1–10.
- 19) Ueno, Y., Sakurai, H., Matsuo, M., Choo, M.K., Koizumi, K., & Saiki, I. (2006) *Br. J. Cancer*, **92**, 1690–1695.
- 20) Argast, G.M., Campbell, J.S., Brooling, J.T., & Fausto, N. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 34530–34536.
- 21) Janes, K.A., Gaudet, S., Albeck, J.G., Nielsen, U.B., Lauffenburger, D.A., & Sorger, P.K. (2006) *Cell*, **124**, 1225–1239.
- 22) Singhirunnusorn, P., Ueno, Y., Matsuo, M., Suzuki, S., Saiki, I., & Sakurai, H. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 12698–12706.
- 23) Nishimura, M., Shin, M.S., Singhirunnusorn, P., Suzuki, S., Kawanishi, M., Koizumi, K., Saiki, I., & Sakurai, H. (2009) *Mol. Cell Biol.*, **29**, 5529–5539.
- 24) Haglund, K. & Dikic, I. (2012) *J. Cell Sci.*, **125**, 265–275.
- 25) Zwang, Y. & Yarden, Y. (2006) *EMBO J.*, **25**, 4195–4206.
- 26) Zhang, X., Gureasko, J., Shen, K., Cole, P.A., & Kuriyan, J. (2006) *Cell*, **125**, 1137–1149.
- 27) Hubbard, S.R. (2006) *Cell*, **125**, 1029–1031.
- 28) Thiel, K.W. & Carpenter, G. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 19238–19243.
- 29) Jura, N., Endres, N.F., Engel, K., Deindl, S., Das, R., Lamers, M.H., Wemmer, D.E., Zhang, X., & Kuriyan, J. (2009) *Cell*, **137**, 1293–1307.
- 30) Red Brewer, M., Choi, S.H., Alvarado, D., Moravcevic, K., Pozzi, A., Lemmon, M.A., & Carpenter, G. (2009) *Mol. Cell*, **34**, 641–651.
- 31) Sørensen, V., Zhen, Y., Zakrzewska, M., Haugsten, E.M., Wälchli, S., Nilsen, T., Olsnes, S., & Wiedlocha, A. (2008) *Mol. Cell Biol.*, **28**, 4129–4141.
- 32) Miao, H., Li, D.Q., Mukherjee, A., Guo, H., Petty, A., Cutter, J., Basilion, J.P., Sedor, J., Wu, J., Danielpour, D., Sloan, A.E., Cohen, M.L., & Wang, B. (2009) *Cancer Cell*, **16**, 9–20.
- 33) Tawadros, T., Brown, M.D., Hart, C.A., & Clarke, N.W. (2012) *Br. J. Cancer*, **107**, 1737–1744.
- 34) Prahallad, A., Sun, C., Huang, S., Di Nicolantonio, F., Salazar, R., Zecchin, D., Beijersbergen, R.L., Bardelli, A., & Bernards, R. (2012) *Nature*, **483**, 100–103.
- 35) Lito, P., Pratilas, C.A., Joseph, E.W., Tadi, M., Halilovic, E., Zubrowski, M., Huang, A., Wong, W.L., Callahan, M.K., Merghoub, T., Wolchok, J.D., de Stanchina, E., Chandarlapaty, S., Poulikakos, P.I., Fagin, J.A., & Rosen, N. (2012) *Cancer Cell*, **22**, 668–682.
- 36) Imami, K., Sugiyama, N., Imamura, H., Wakabayashi, M., Tomita, M., Taniguchi, M., Ueno, T., Toi, M., & Ishihama, Y. (2012) *Mol. Cell. Proteomics*, **11**, 1741–1757.