

Autocrine Motility Factor は転移腫瘍における診断・治療のターゲット分子となり得るか

羽賀新世

A Possibility that AMF will Serve as a Target Molecule for the Diagnosis and Treatment in a Metastatic Neoplasm

Arayo HAGA

Department of Hygienics, Gifu Pharmaceutical University, 5-6-1 Mitahora-Higashi, Gifu 502-8585, Japan

(Received October 22, 2004)

The Autocrine Motility Factor (AMF) identified as a tumor cell motile stimulation factor is a key molecule of invasion and metastasis. The AMF is also identified as neuroleukin (NLK) and maturation factor (MF) which are secreted phosphohexose isomerase (PHI, PGI) from anaplastic cells. Tumor AMF promotes cellular locomotion or invasion, and regulates tumor MMPs secretion or apoptotic resistance. The AMF was thought to be an autocrine factor as the name shows it, and it is peculiar to malignant cells. However we found paracrine effect of AMF against tumor surrounding host tissues. Especially, endothelial cells which are essential parts of tumor induced angiogenesis or ascites accumulation express the AMF-receptor and they responded to AMF stimulation. Metastasis is a most complicated biological phenomenon that a large number of molecules or factors induced by tumor and host are related, thus AMF is also unusual molecule reacting between tumor and host tissues, and therefore AMF should be a target of treatment or diagnosis of cancer.

Key words—Autocrine Motility Factor (AMF); phospho glucose isomerase (PGI); metastasis; cell motility; angiogenesis; apoptosis

1. はじめに

転移は悪性腫瘍の最たる表現型であり、その適切な制御が治療成績向上や患者の QOL 改善に貢献するであろうことは疑いがない。転移は腫瘍と宿主との複雑な相互作用の結果成立する現象で、細胞レベルでみると腫瘍による血管新生、周辺宿主組織の破壊、遠隔宿主組織への接着・移動、遠隔宿主組織での増殖といった一連のサイクルがあるかに思える。実際ある種の腫瘍では転移先が決まっており、転移マップも作成され治療に応用されている。この腫瘍と宿主との相互作用には多くの転移関連形質とともに様々な制御あるいは増強に関わる分子種が介在することが明らかにされている。この一部を増強又は阻害して腫瘍の転移・増殖を分子レベルで抑制する試みもなされている。本稿ではこのうち腫瘍細胞の

移動に焦点を当て、それを刺激する因子の1つである Autocrine Motility Factor (AMF) の性質について解説し、ついでその性質に基づいた AMF の転移腫瘍における診断・治療への応用の可能性を考察したい。

2. AMF とは

米国 NIH の Liotta らは *in vitro* 実験によく用いられるヒトメラノーマ細胞株 (A2058) の培養上清をゲル濾過カラムなどにより分離し、A2058 の運動能 (chemotaxis) を刺激する活性画分を腫瘍分泌性の AMF として 1986 年に報告した。¹⁾ AMF は計算上 63149Da の分子量を有するが SDS-PAGE 上では 55 から 57 kDa を示し、弱酸性の等電点を示す。^{2,3)} いくつかの系統の異なる腫瘍細胞株で試験されたが AMF はその運動性 (ケモカイネシス, ケモタキシス) を 50 から 100 pg/ml ほどの濃度で約 1.5 倍に増強する。¹⁻³⁾ またマウスを用いた *in vivo* モデルにおいても転移能を増強させることが報告されている。^{4,5)}

一方 AMF 刺激を感受する細胞表面受容体

岐阜薬科大学衛生学教室 (〒502-8585 岐阜市三田洞東 5-6-1)

e-mail: arayo@gifu-pu.ac.jp

本総説は、平成 16 年度日本薬学会東海支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

(AMFR) は 78 kDa の糖蛋白質 gp78 として知られている。ピーナツレクチンに親和性を有する分子がメラノーマ細胞の膜画分から単離され、そのモノクローナル、ポリクローナル抗体が細胞運動を刺激することや細胞表面の trailing edge, leading lamella に局在することなどから AMF 受容体と考えられた。⁶⁻⁸⁾ その後クローニングがなされ C 末端が細胞外に存在するユニークな 7 回膜貫通型受容体であることが推測された。⁹⁾ 近年ユビキチンリガーゼとしての作用も明らかにされたが、¹⁰⁾ その発現は腫瘍の悪性度とよく相関していることが gp78 のモノクローナル抗体 (3F3A) を用いた免疫組織学的研究により知られている。¹¹⁻¹⁶⁾ したがって AMF とともに gp78 の発現もまた腫瘍の伸展・転移に深く関わる因子であると考えられる。

3. AMF は多機能分子である

AMF 発見から 10 年後の 1996 年に Watanabe らはマウス繊維芽肉腫細胞の無蛋白培養系から AMF を精製し、部分アミノ酸シーケンスに成功し、グルコース 6-リン酸イソメラーゼ (PGI, PHI) と相同性を有することを明らかにした。¹⁷⁾ その後遺伝子クローニングが行われ、同一分子であることが理解された。¹⁸⁾ PGI は解糖系でおなじみの酵素であり、グルコース 6-リン酸とフルクトース 6-リン酸の異性化を触媒する重要な酵素であり、欠損症では溶血性貧血などの症状を示す。¹⁹⁾

1996 年の発見に先立ち、運動ニューロンの異常に関与する因子である neuroleukin (NLK) がクローニングされ PGI と高い相同性を有することが報告されていた。^{20,21)} NLK は神経栄養性因子と考えられ、レクチン刺激を受けた T-細胞から分泌され、^{22,23)} 神経細胞の膜運動も刺激できる。²⁴⁾ また最近 NLK の受容体も gp78 であり、その発現と刺激は学習に関わる神経細胞の分化誘導に関与することも示された。²⁵⁾

Phytohemagglutinin で刺激した末梢血リンパ球の培養上清中に骨髓性白血病を単球性細胞にまで分化させる作用を見出した Xu らは分化誘導活性を指標に精製を行い 54.3 kDa の分子を単離し、やはり PGI に相同性を有し、精製した PGI 酵素も分化誘導能を示すことをつきとめ Maturation Factor (MF) として報告している。²⁶⁾

MF に関する報告は以後なされていないが、した

がって今日では AMF, NLK, PGI, MF は同一分子種として扱われ、キーワード検索などではすべてがヒットするようになっている。

4. AMF の分泌

上述のように AMF/NLK/MF はすべて細胞外に分泌された PGI であるといえる。しかしながら PGI というまでもなく細胞内で作用する酵素であり、したがってシグナルペプチドもその配列中には存在しない。¹⁸⁾ それがなぜ腫瘍や他の幼弱化した細胞では分泌されるのか詳細は理解されていないが、腫瘍細胞における AMF 分泌はカルシウムイオノフォアや熱刺激で促進され、ER ゴルジ装置の阻害剤では影響を受けないことなどから非古典経路で細胞外に輸送されるものと考えられている。¹⁸⁾ また分泌された AMF はセリンリン酸化を受けていることも分かっている。²⁷⁾

単純に考えると細胞内で多く生産されるようになったため、剩って細胞外に排出されるようになると思われるが、それを実証した報告もなされている。すなわち正常なマウス繊維芽細胞にヒト AMFcDNA 発現ベクターを形質転換すると mRNA が過剰に発現し、AMF を分泌するクローンが得られ、マウスに対する造腫瘍性が認められるようになったことが報告されている。²⁸⁾

したがって腫瘍においては PGI 遺伝子の発現制御に何らかの異常が起こってスイッチが入りっぱなしになるのかあるいはその異常が腫瘍の progression そのものの 1 つのきっかけとなるのかも知れない。

5. AMF はパラクライン因子でもある

AMF はその名が示すとおり、腫瘍が分泌してオートクラインに自身の運動性を刺激し、浸潤・転移を促進する因子と考えられ、前述のように受容体 gp78 の発現も腫瘍を中心に研究されてきた。しかし冒頭に記述したように、転移は腫瘍細胞と宿主組織との相互作用の結果進行すると考えられる。gp78 をクローニングしたグループもその mRNA がマウスにおいて脾臓など一部を除き広く発現していることを確認している。したがって腫瘍から分泌された AMF も当然に周辺組織・細胞に対して gp78 を介して何らかの影響を及ぼすはずである。

この考えのもと、筆者らは宿主の血管系に注目して試験を行ったところ、血管内皮細胞に gp78 発現

を認め、AMF が作用することを明らかにした。すなわち腫瘍由来の AMF は内皮細胞の遊走を刺激し、管腔形成を促進することを見出した。²⁹⁾ おもに原発腫瘍巣周辺に認められる脆弱な新生血管は悪性腫瘍における病理学的な特徴の1つであり、腫瘍の成長を促すとともに転移腫瘍の宿主組織への入り口となると考えられている。従来、腫瘍が産生する内皮細胞成長因子 (VEGF) が主要な血管新生因子として知られていたが、AMF のような別の腫瘍由来因子もこれに関わっていることが示された。事実 AMF と同様なオートクライン型の腫瘍細胞運動刺激因子であるオートタキサン (ATX) にも腫瘍血管新生促進作用が報告されている。³⁰⁾

上部消化器癌などにしばしばみられる腹水や肺癌によって引き起こされる胸水の貯留は横隔膜、腹膜や腸間膜、胸膜などを形成する内皮あるいは中皮細胞層に間隙が生じるためであると考えられており、患者に著しい衰弱をもたらす QOL を低下させる。

膜を裏打ちする細胞層は密な敷石状になっているが、腫瘍による侵襲や腫瘍由来の因子によって細胞同士の接着が破壊されることが知られている。われわれはこれらの内皮や中皮細胞にもやはり gp78 を認め、AMF 刺激によって細胞の形態が速やかに変化して細胞間に亀裂が生じ易くなることを見出した。マウス腹水癌のモデルを使って *in vivo* で試験した結果、腫瘍由来の AMF は腹水の貯留を著しく促進すること、また腹水をよく貯留させる亜株は親株に比較して明らかに AMF を多く分泌していることなどを解明した。³¹⁾

すなわち AMF は宿主に対する腫瘍由来のパラクラインな因子としても血管新生や腹水貯留など癌の悪性化に深く関わっている。

6. AMF のシグナルと表現型

AMF が受容体 gp78 を刺激することによって引き起こされる細胞形態変化、運動に至る細胞内シグナルも広く研究されている。AMF の発見当初からリン脂質メチル化が起こることが見出されていたが、¹⁾ その後 lipoygenase 代謝の関与も報告されている。^{32,33)} また AMF 刺激によって受容体 gp78 がリン酸化を受けること、³⁴⁾ 百日咳毒素によって細胞運動刺激が抑制されること³⁵⁾ から、gp78 の下流には GTP 結合蛋白質が存在するものと考えられていたが、近年 small GTPase である Rho が関わっている

ことが明らかになった。³⁶⁾ さらにこれらのシグナリングにはプロテインキナーゼ A には依存しないチロシンキナーゼ、プロテインキナーゼ C (PKC) が関与することも示唆されている。^{37,38)}

一方、細胞運動刺激による浸潤・転移増強以外にも腫瘍の悪性化に直接関わるような AMF 刺激に由来するシグナルの表現型があることが近年相ついで報告され分かってきた (Fig. 1)。前述の宿主血管系に対する作用を詳細に検討した結果、宿主細胞の gp78 に対する AMF 刺激は PKC 及びホスファチジルイノシトール 3-リン酸キナーゼ (PI3K) を介する経路を通して VEGF 受容体 (Flt-1) の発現を促し、また腫瘍自身に対してはシグナリングは不明ながら VEGF 分泌を促進させることを明らかにした。³⁹⁾ 結果として前述のように腫瘍由来の AMF は宿主血管新生を増強する。

また AMF 発現ベクターを構築し、腫瘍細胞株に形質転換して親株に比較して高い AMF 分泌能を示すクローンを選択して、その遺伝子発現をマイクロアレイで親株のそれと比較した結果、AMF 高分泌株ではアポトーシス耐性であること、マトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) を高分泌することが予測されるデータが得られた。

AMF 高分泌腫瘍株では多くのアポトーシス抑制遺伝子が増強し、促進遺伝子が減弱していたが、特筆すべきは apoptotic protease activating factor-1 (Apaf-1) と caspase-9 両遺伝子が消失していたことである。⁴⁰⁾ Apaf-1 と caspase-9 は apoptosome と呼ばれる巨大分子を構成するコアとなり、ミトコンドリア経路においてアポトーシスを制御する要と考えられている。この apoptosome 遺伝子の消失は前出の AMF 高分泌腹水癌細胞でも観察され、AMF の中和によって復活すること、PKC、PI3K 及び mitogen-activated protein kinase (MAPK) を介するシグナルによって起こっていることを明らかにした。実際、AMF 高分泌腫瘍細胞株は抗腫瘍剤であるマイトマイシン C に強い抵抗性を示した。⁴⁰⁾ Tsutsumi からも AMF 遺伝子を導入した繊維芽細胞に対して PI3K 及び MAPK 阻害によってアポトーシス誘導が起こることを確認している。²⁸⁾ また NLK についても神経細胞に対して同様の作用があることが報告されている。⁴¹⁾

MMP は活性中心に亜鉛原子を配位する金属酵素

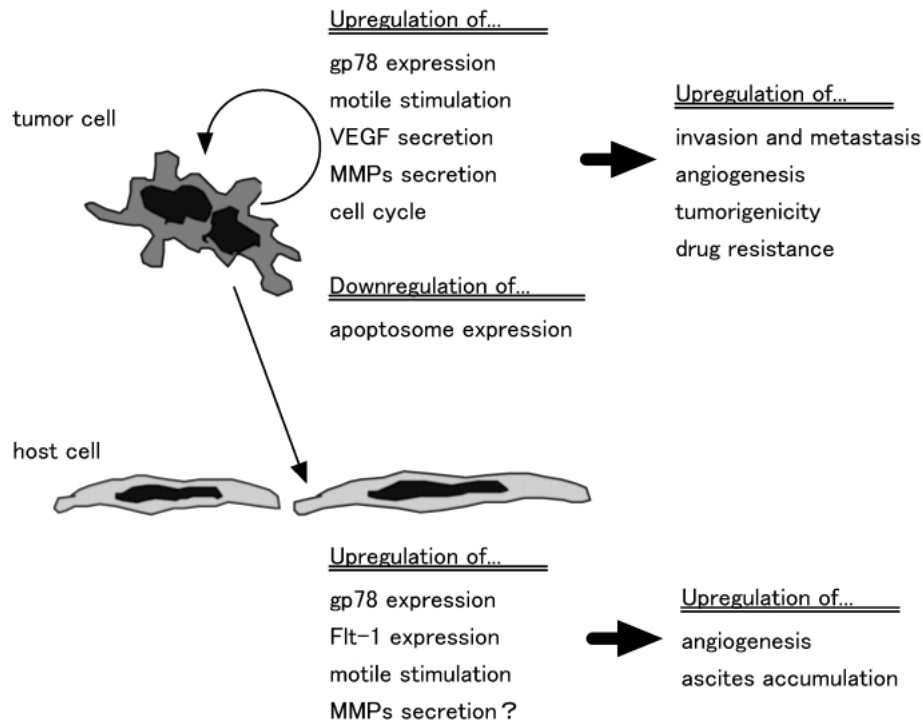


Fig. 1. Autocrine and Paracrine Effect of AMF

で主にコラーゲンなどの構造タンパク質を基質とするプロテアーゼファミリーであり、特異的な内在性のインヒビターである tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) によって活性制御を受ける。^{42,43)} 組織のリモデリングなどに重要な役割を果たす酵素群であるが、担癌生体においては腫瘍・宿主双方で制御のバランスが崩れ腫瘍による組織破壊に利用されると考えられている。^{42,43)} われわれは AMF 高分泌腫瘍株ではこのうち MMP-1, -2, -3 の発現が増強しているが TIMP のレベルは変わらず、したがって基底膜再構成基質に対して高い浸潤能を示すこと、この遺伝子発現増強は転写レベルで起こっていることまで解明したが、最近別のグループから肝癌細胞を AMF で刺激すると MMP-3 分泌が促進されることが先に報告された。⁴⁴⁾ しかし細胞内シグナリングに関しては不明であり、今後明らかにする必要がある。

さらに AMF をトランスフォームした繊維芽細胞についてマイクロアレイが行われた結果、AMF 高分泌株では cyclin D1 発現と cyclin-依存性キナーゼ活性が上昇し、そのインヒビターである p27^{Kip1} が減少しており G₁ 期から S 期への移行が促進され細胞増殖が活発になることも明らかになっている。⁴⁵⁾

7. AMF の立体構造と受容体結合機構

ある生体分子を標的とした合理的な阻害剤を開発する上でその分子の立体構造に関する情報は必要不可欠である。PGI 構造解析の研究は既に 1970 年代から行われ始め、^{46,47)} PGI が AMF/NLK/MF と同定されたのちにも相ついで報告が出されている。⁴⁸⁻⁵²⁾ それらによると PGI はダイマーであり、ヒトの場合アスパラギン 117 からバリン 288 までのシーケンス中に基質結合部位が存在する。⁵³⁾

AMF と gp78 との結合機構には、AMF の糖鎖認識が関与することが当初から予想されていた。AMF と PGI の相同性が見出された際には、市販されているウサギ PGI に細胞運動刺激活性が認められたこと、精製した AMF の活性は PGI 酵素阻害剤であるエリスロース 4-リン酸 (E4P) や 6-ホスホグルコン酸の添加によって阻害されることから、PGI としてのリン酸化単糖結合能が受容体認識に利用されている可能性が指摘されている。¹⁷⁾ 筆者らも AMF によって誘導される宿主血管新生が E4P 添加によって阻害されることを確認している。²⁹⁾ AMF と基質であるリン酸化単糖との結晶の立体構造解析の結果⁵³⁾ から、リン酸化単糖を構成する原子それぞれに近い位置にあるアミノ酸をそれぞれ別の

アミノ酸に置換した変異 AMF を 18 種類作成して細胞運動刺激活性の変化を比較した結果、AMF の受容体結合には基質のリン酸基認識が重要であるらしいこと、また N-糖鎖を持たない gp78 遺伝子を作成して腫瘍細胞に導入した場合、その gp78 は機能しなかったことなどから AMF の受容体認識にはやはり gp78 の N-糖鎖が必要でそれはリン酸化あるいは硫酸化されていることが予想された (投稿中)。スキッチャード解析の結果、AMF と gp78 との結合は 2 相性のプロットを示す事実^{54,55} もそのことを裏付けていると思われる。また gp78 コアプロテイン部分への相互作用について Amraei と Nabi が AMF の N 末端領域は関与しないことを報告しており、⁵⁶ われわれもいくつかの部分領域を欠如させた AMF を作成して試験をしたところ、基質結合領域と C 末端領域を併せ持つ AMF にのみ活性があったことを確認している (Fig. 2) (投稿中)。

8. 診断・治療への展望

前述のように AMF 刺激によって引き起こされる現象の多くは腫瘍の悪性形質の獲得に関与する極めて深刻な病態をもたらす。したがって AMF を標的とした癌の診断・治療は有用であるかに思える。古くから様々な癌患者の血中糖代謝において PGI 活性が高いことが数多く報告されており、⁵⁷⁻⁶³ PGI 活性の転移形成への相関も報告されている。⁶⁴ 前述のように腫瘍における AMF は細胞外の PGI 分子であり、その分泌は腫瘍などの未分化細胞に限られる。これらの事実は腫瘍のステージ診断や転移巢の

判定に AMF が非常に有用であることを示しているが、現在までのところ ELISA 法などの定量法に関する報告はなされていない。また (特に悪性な) 腫瘍において AMF の分泌が促進される機構を詳細に解明することも重要であろう。すなわちハウスキーピング遺伝子である PGI の腫瘍における制御機構をさらに詳細に解明することが望まれる。

治療への応用については AMF と受容体分子 gp78 との結合を阻害することが考えられる。実験的には PGI 酵素阻害剤で成果が得られているが、PGI は解糖系に重要な普遍的に存在する酵素分子であり、その阻害は正常な代謝を脅かすため副作用が懸念される。したがって立体構造解析の成果を応用しつつ AMF の基質結合ポケットに収納されなおかつ細胞内には取り込まれないような化学物質の合理的なデザインが必要であろう。この点、gp78 の N-糖側鎖はあるいはその類似体は有効な AMF 結合阻害をなし得ると考えられるが、gp78 の糖鎖解析は発現量が限られていることもあって行われてはいない。

免疫学的な治療としては中和抗体の利用も考えられる。われわれがウサギに免疫して得たポリクローナル抗体は腫瘍細胞運動、腫瘍による血管新生や腹水貯留を抑制し、抗癌剤 (アポトーシス) 耐性も改善させた。^{29,31,40} しかしながら現在までに中和作用を有するモノクローナル抗体の作成には至っておらず今後の課題である。

さらに gp78 の側から結合阻害を講じることも研

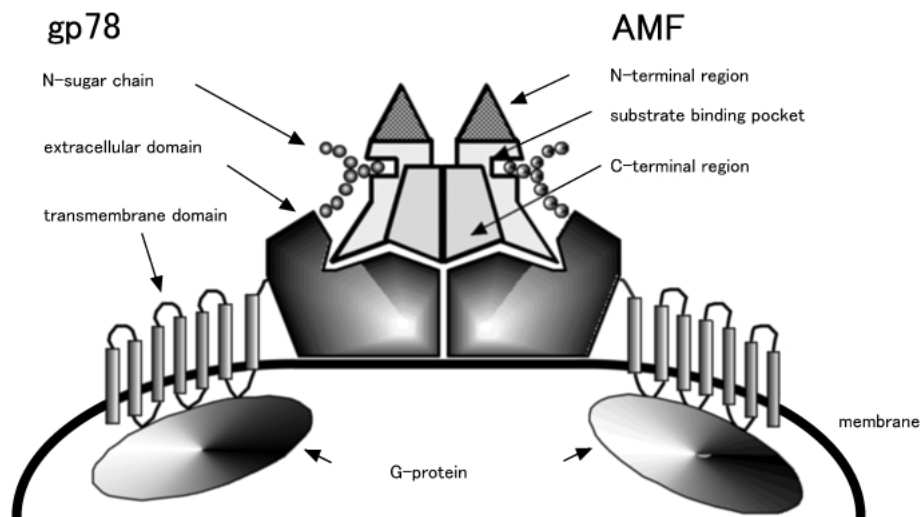


Fig. 2. Proposed Model of AMF and AMFR Binding

究されるべきである。これまでに得られている抗 gp78 抗体はメラノーマ細胞膜より精製された分子を免役したものであり、細胞運動を刺激する。したがって糖鎖を持たない組換え体分子の作出とその免役による抗体作成、立体構造解析などが待たれる。

REFERENCES

- 1) Liotta L. A., Mandler R., Murano G., Katz D. A., Gordon R. K., Chiang P. K., Schiffmann E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 3302–3306 (1986).
- 2) Silletti S., Watanabe H., Hogan V., Nabi I. R., Raz A., *Cancer Res.*, **51**, 3507–3511 (1991).
- 3) Watanabe H., Carmi P., Hogan V., Raz T., Silletti S., Nabi I. R., Raz A., *J. Biol. Chem.*, **266**, 13442–13448 (1991).
- 4) Watanabe H., Nabi I. R., Raz A., *Cancer Res.*, **51**, 2699–2705 (1991).
- 5) Watanabe H., Kanbe K., Chigira M., *Clin. Exp. Metastasis*, **12**, 155–163 (1994).
- 6) Nabi I. R., Raz A., *Int. J. Cancer*, **40**, 396–402 (1987).
- 7) Nabi I. R., Raz A., *Cancer Res.*, **48**, 1258–1264 (1988).
- 8) Nabi I. R., Watanabe H., Raz A., *Cancer Res.*, **50**, 409–414 (1990).
- 9) Shimizu K., Tani M., Watanabe H., Nagamachi Y., Niinaka Y., Shiroishi T., Ohwada S., Raz A., Yokota J., *FEBS Lett.*, **456**, 295–300 (1999).
- 10) Fang S., Ferrone M., Yang C., Jensen J. P., Tiwari S., Weissman A. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 14422–14427 (2001).
- 11) Otto T., Birchmeier W., Schmidt U., Hinke A., Schipper J., Rubben H., Raz A., *Cancer Res.*, **54**, 3120–3123 (1994).
- 12) Nakamori S., Watanabe H., Kameyama M., Imaoka S., Furukawa H., Ishikawa O., Sasaki Y., Kabuto T., Raz A., *Cancer*, **74**, 1855–1862 (1994).
- 13) Maruyama K., Watanabe H., Shiozaki H., Takayama T., Gofuku J., Yano H., Inoue M., Tamura S., Raz A., Monden M., *Int. J. Cancer*, **64**, 316–321 (1995).
- 14) Hirono Y., Fushida S., Yonemura Y., Yamamoto H., Watanabe H., Raz A., *Br. J. Cancer*, **74**, 2003–2007 (1996).
- 15) Nagai Y., Ishikawa O., Miyachi Y., Watanabe H., *Dermatology*, **192**, 8–11 (1997).
- 16) Takanami I., Takeuchi K., Naruke M., Kodaira S., Tanaka F., Watanabe H., Raz A., *Tumour Biol.*, **19**, 384–389 (1998).
- 17) Watanabe H., Takehama K., Date M., Shinozaki T., Raz A., *Cancer Res.*, **56**, 2960–2963 (1996).
- 18) Niinaka Y., Paku S., Haga A., Watanabe H., Raz A., *Cancer Res.*, **58**, 2667–2674 (1998).
- 19) Kugler W., Lakomek M., *Baillieres Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, **13**, 89–101 (2000).
- 20) Chaput M., Claes V., Portetelle D., Cludts I., Cravador A., Burny A., Gras H., Tarter A., *Nature*, **332**, 454–455 (1988).
- 21) Faik P., Walker J. I., Redmill A. A., Morgan M. J., *Nature*, **332**, 455–457 (1988).
- 22) Gurney M. E., Apatoff B. R., Spear G. T., Baumel M. J., Antel J. P., Bania M. B., Reder A. T., *Science*, **234**, 574–581 (1986).
- 23) Gurney M. E., Heinrich S. P., Lee M. R., Yin H. S., *Science*, **234**, 566–574 (1986).
- 24) Gurney M. E., *Nature*, **307**, 546–548 (1984).
- 25) Luo Y., Long J. M., Lu C., Chan S. L., Spangler E. L., Mascarucci P., Raz A., Longo D. L., Mattson M. P., Ingram D. K., Weng N., *J. Neurochem.*, **80**, 354–361 (2002).
- 26) Xu W., Seiter K., Feldman E., Ahmed T., Chiao J. W., *Blood*, **87**, 4502–4506 (1996).
- 27) Haga A., Niinaka Y., Raz A., *Biochim. Biophys. Acta*, **1480**, 235–244 (2000).
- 28) Tsutsumi S., Hogan V., Nabi I. R., Raz A., *Cancer Res.*, **63**, 242–249 (2003).
- 29) Funasaka T., Haga A., Raz A., Nagase H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **284**, 1116–1125 (2001).
- 30) Nam S. W., Clair T., Kim Y. S., McMarlin A., Schiffmann E., Liotta L. A., Stracke M. L., *Cancer Res.*, **61**, 6938–6944 (2001).
- 31) Funasaka T., Haga A., Raz A., Nagase H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **293**, 192–200 (2002).
- 32) Silletti S., Timar J., Honn K. V., Raz A., *Cancer Res.*, **54**, 5752–5756 (1994).
- 33) Timar J., Silletti S., Bazaz R., Raz A., Honn K. V., *Int. J. Cancer*, **55**, 1003–1010 (1993).
- 34) Stracke M. L., Guirguis R., Liotta L. A., Schiffmann E., *Biochem. Biophys. Res. Com-*

- mun.*, **146**, 339–345 (1987).
- 35) Watanabe H., Carmi P., Hogan V., Raz T., Silletti S., Nabi I. R., Raz A., *J. Biol. Chem.*, **266**, 13442–13448 (1991).
- 36) Tsutsumi S., Gupta S. K., Hogan V., Collard J. G., Raz A., *Cancer Res.*, **64**, 4484–4490 (2002).
- 37) Kanbe K., Chigira M., Watanabe H., *Biochim. Biophys. Acta*, **1222**, 395–399 (1994).
- 38) Silletti S., Paku S., Raz A., *Am. J. Pathol.*, **148**, 1649–1660 (1996).
- 39) Funasaka T., Haga A., Raz A., Nagase H., *Int. J. Cancer*, **101**, 217–223 (2002).
- 40) Haga A., Funasaka T., Niinaka Y., Raz A., Nagase H., *Int. J. Cancer*, **105**, 707–714 (2003).
- 41) Romagnoli A., Oliverio S. N., Evangelisti C., Iannicola C., Ippolito G., Piacentini M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **302**, 448–453 (2003).
- 42) Woessner J. F., Nagase H., “Matrix Metalloproteinases and TIMPs,” Oxford University Press, 2000.
- 43) “Methods in Molecular Biology,” Vol. 151, ed. by Clark I. M., Humana Press, 2001.
- 44) Yu F.-L., Liao M.-H., Lee J.-W., Shih W.-L., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **314**, 76–82 (2004).
- 45) Tsutsumi S., Yanagawa T., Shimura T., Fukumori T., Hogan V., Kuwano H., Raz A., *J. Biol. Chem.*, **278**, 32165–32172 (2003).
- 46) Muirhead H., Shaw P. J., *J. Mol. Biol.*, **89**, 195–203 (1974).
- 47) Shaw P. J., Muirhead H., *J. Mol. Biol.*, **109**, 475–485 (1977).
- 48) Sun Y. J., Chou C. C., Chen W. S., Wu R. T., Meng M., Hsiao C. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 5412–5417 (1999).
- 49) Chou C. C., Sun Y. J., Meng M., Hsiao C. D., *J. Biol. Chem.*, **275**, 23154–23160 (2000).
- 50) Jeffery C. J., Bahnson B. J., Chein W., Ringe D., Petsko G. A., *Biochemistry*, **39**, 955–964 (2000).
- 51) Lee J. H., Chang K. Z., Patel V., Jeffery C. J., *Biochemistry*, **40**, 7799–7805 (2001).
- 52) Read J., Pearce J., Li X., Muirhead H., Chirgwin J., Davies C., *J. Mol. Biol.*, **309**, 447–463 (2001).
- 53) Tanaka N., Haga A., Uemura H., Akiyama H., Funasaka T., Nagase H., Raz A., Nakamura K. T., *J. Mol. Biol.*, **318**, 985–997 (2002).
- 54) Niinaka Y., Haga A., Negishi A., Yoshimasu H., Raz A., Amagasa T., *Oral Oncol.*, **38**, 49–55 (2002).
- 55) Tsutsumi S., Gupta S. K., Hogan V., Tanaka N., Nakamura K. T., Nabi I. R., Raz A., *FEBS Lett.*, **534**, 49–53 (2003).
- 56) Amraei M., Nabi I. R., *FEBS Lett.*, **525**, 151–155 (2002).
- 57) Bodansky O., *Cancer*, **7**, 1200–1226 (1954).
- 58) Rose A., West M., Zimmerman H. J., *Cancer*, **14**, 726–733 (1961).
- 59) West M., Schwartz M. A., *Cancer*, **15**, 931–935 (1962).
- 60) Griffith M. M., Beck J. C., *Cancer*, **16**, 1032–1041 (1962).
- 61) Baumann M., Brand K., *Cancer Res.*, **48**, 7018–7021 (1988).
- 62) Baumann M., Kappl A., Lang T., Brand K., Siegfried W., Paterok E., *Cancer Invest.*, **8**, 351–356 (1990).
- 63) Filella X., Molina R., Jo J., Mas E., Ballesta A. M., *Tumour Biol.*, **12**, 360–367 (1991).
- 64) Schwartz M. K., *Cancer*, **37**, 542–548 (1976).