

## 低酸素が誘導する血管平滑筋細胞遊走因子としての トロンボスポンジン-1の作用機構

高橋 稔, 岡 真優子,\* 池田貴子, 秋葉 聡, 佐藤隆司

### The Role of Thrombospondin-1 in Hypoxia-induced Migration of Human Vascular Smooth Muscle Cells

Minoru TAKAHASHI, Mayuko OKA,\* Takako IKEDA, Satoshi AKIBA, and Takashi SATO

Department of Pathological Biochemistry, Kyoto Pharmaceutical University, Misasagi,  
Yamashina-ku, Kyoto 607-8414, Japan

(Received October 15, 2007)

When the arterial wall thickens and blood-diffusion capacity is low in atherosclerotic lesions, hypoxia is a key factor for the development of atherosclerosis. Under hypoxic conditions, >100 genes, including those encoding many growth factors, are known to be induced by a transcriptional factor, hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ). In this study, to examine whether HIF-1 $\alpha$ -dependent induction of growth factors is associated with the proliferation and migration of vascular cells in atherosclerotic lesions, we studied the role of thrombospondin-1 (TSP-1), which is induced by hypoxia, in the pathogenesis and progression of atherosclerosis in human coronary artery smooth muscle cells (CASMCs). Under hypoxic conditions, expression of HIF-1 $\alpha$  increased time-dependently in human CASMCs with a concomitant increase in the proliferation and migration of cells. Under these conditions, the mRNA and protein levels of TSP-1 and the mRNA level of TSP-1 receptor, integrin  $\beta_3$ , were also enhanced. Neutralizing antibody against TSP-1 reduced hypoxia-induced migration, but not proliferation. Similarly, RGD peptide, which binds to integrin  $\beta_3$ , inhibited cell migration under hypoxia. In HIF-1 $\alpha$ -knockdown CASMCs, in which expression of HIF-1 $\alpha$  and TSP-1 mRNA and proteins is suppressed, hypoxia-induced migration was markedly reduced. In conclusion, hypoxia in atherosclerotic lesions induces TSP-1, which plays important roles in acceleration of the migration of human CASMCs and the progression of atherosclerosis.

**Key words**—thrombospondin-1; hypoxia; vascular cell migration

#### 1. はじめに

動脈硬化症病巣の形成に伴ってみられる特徴の1つは内膜の肥厚であり、その主要な構成細胞は血管平滑筋細胞である。血管平滑筋細胞は、通常は収縮と弛緩を繰り返して血圧や血流を調節し分化した状態で中膜に存在しているが、内皮下腔に遊走した細胞は、増殖能を有し脱分化した状態にある。このように形質変化を伴った血管平滑筋細胞の遊走と増殖が、血管壁肥厚の病変形成を著明に促進することから、血管平滑筋細胞は動脈硬化症での進展因子と考えられている。さらに、遊走した血管平滑筋細胞の

存在する肥厚部位が、低酸素状態であることが報告されており、<sup>1)</sup> 低酸素が本細胞の増殖や遊走の引き金となっている可能性が考えられるが、その詳細については明らかではない。

低酸素状態にある細胞では、遺伝子の誘導が起こることが知られており、この誘導には転写因子である hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) が関与している。HIF-1 $\alpha$  は basic helix-loop-helix-PAS (bHLH-PAS) domain を持つ 826 アミノ酸からなるタンパク質であり、<sup>2)</sup> 低酸素状態では N 末端側及び C 末端側に存在する 2 つの核移行シグナル (nuclear translocation signal (NLS)-N と NLS-C) を介して細胞質から核に移行する。<sup>3)</sup> しかし、酸素存在下において HIF-1 $\alpha$  は、oxygen-dependent degradation domain (ODD) の P<sub>402</sub> 及び P<sub>564</sub> が水酸化を受け、それに伴いユビキチン E3 リガーゼである von Hippel-Lin-

京都薬科大学病態生化学教室 (〒607-8414 京都市山科区御陵中内町 5)

\*e-mail: mayuko@mb.kyoto-phu.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 127 年会シンポジウム SD4 で発表したものを中心に記述したものである。

dau タンパク質 (pVHL) によりユビキチン化されて 26S プロテアソームによる分解を受ける。<sup>4,5)</sup> このため、低酸素下では安定に存在するが、通常酸素濃度下ではその発現がほとんど認められない。低酸素により安定化した HIF-1 $\alpha$  は、細胞質では heat shock protein-90 と結合して存在し、<sup>6,7)</sup> p42/p44 MAP キナーゼによりリン酸化されたのちに核内へと移行する。<sup>8-10)</sup> 核内の HIF-1 $\alpha$  は aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) とのヘテロ二量体である HIF-1 を形成し、<sup>11,12)</sup> この HIF-1 が転写因子として種々の遺伝子の誘導を引き起こす。<sup>13,14)</sup> これまでに、がんの悪化を促す血管新生は、HIF-1 依存的に誘導された vascular endothelial growth factor が重要な役割を担っていることが知られており、<sup>15)</sup> その他にも腎症<sup>16)</sup> や心肥大症<sup>17)</sup> における低酸素による HIF-1 の活性化が、病態の進展に係わっていることが知られている。

上述したように、動脈硬化病巣部である内膜肥厚部位が低酸素状態にあることから、病巣形成の引き金となる血管平滑筋細胞の遊走や増殖は、低酸素とそのときに安定化する HIF-1 $\alpha$  の影響を受けていることが考えられる。本稿では、血管平滑筋細胞の遊走と増殖に対する低酸素の影響に着目し、動脈硬化病巣部位に多く局在する増殖因子であり低酸素状態で誘導されることが知られている thrombospondin-1 (TSP-1)<sup>18,19)</sup> の役割について述べる。

## 2. 低酸素による細胞の遊走

進行した動脈硬化症の血管内皮下腔には、脂質コアを中心にマクロファージや中膜から遊走した血管平滑筋細胞が存在しており、血管壁の肥厚をもたらしている。血管平滑筋細胞の遊走や増殖に係わる因子としては、血管障害に伴い病巣部位に高発現する platelet-derived growth factor<sup>20)</sup> や basic-fibroblast growth factor<sup>21)</sup> などが、多くの *in vitro* の実験結果から明らかにされている。さらに、動脈硬化病巣に多く局在する TSP-1 のようなマトリックスタンパク質にも同様の作用が報告されており、<sup>22,23)</sup> これら増殖因子を外因的に加えたときの様々な影響が評価されてきた。しかし、低酸素による血管平滑筋細胞の遊走や増殖への影響、さらには、本細胞が発現する増殖因子の種類やそれらによるオートクライン的作用については評価されていない。本稿では、これらを明らかにし、低酸素の環境における血管平滑筋

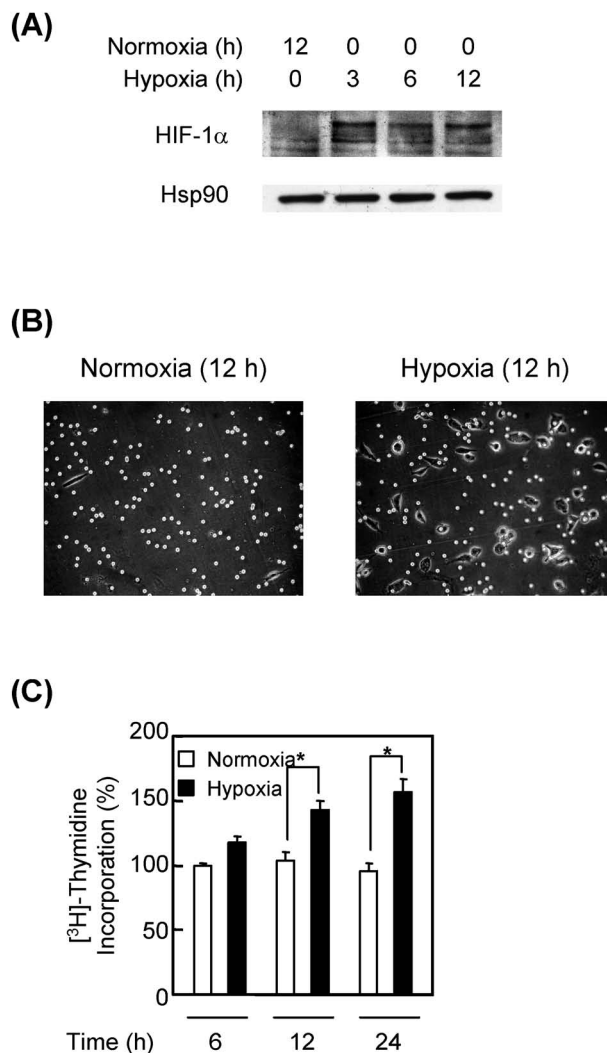


Fig. 1. The Stabilization of HIF-1 $\alpha$  Protein and the Enhancement of Migration and Proliferation under Hypoxic Conditions in Human CASMCs

(A) CASMCs were exposed to 1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> for 3, 6 or 12 hours. Whole cell lysates were analyzed by SDS-PAGE with 7.5% polyacrylamide gel and immunoblotted with anti-HIF-1 $\alpha$  and anti-Hsp90 (as loading control) antibodies. (B) The migration activity of CASMCs was determined using matrigel invasion system (BD Biosciences). After incubation of CASMCs at 37°C for 12 hours, photos of cells migrated from the upper to the lower side of the membranes were taken with a microscope. (C) CASMCs were incubated under normoxia or hypoxia for 6, 12 or 24 hours. The incorporation of [<sup>3</sup>H]-thymidine was analyzed with a liquid scintillation counter. Data are as the mean  $\pm$  S.D. of three different cell preparations and expressed as a ratio of normoxia for 6 hours. \**p* < 0.001 vs. normoxia for each of times.



高橋 稔

2007年3月京都薬科大学大学院薬学研究所博士前期課程修了。4年次の2004年4月から同大学病態生化学教室で卒業研究としての実験を開始したのち、2005年4月に同教室の大学院に進学して本格的に低酸素の実験に取り組みました。現在、(株)ファークスターのみやま薬局で保険薬剤師としてDI業務に従事しています。

細胞の機能を解明した結果について詳述する。

低酸素状態 (1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) では、正常ヒト冠動脈血管平滑筋細胞 (Cambrex より購入) での HIF-1 $\alpha$  の発現がみられるのに対して、通常酸素状態 (20% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) では全くみられなかった [Fig. 1(A)]. この発現は、低酸素による HIF-1 $\alpha$  タンパク質の安定化に起因するもので、HIF-1 $\alpha$  mRNA の発現は低酸素による誘導を受けない。また、HIF-1 $\alpha$  と ARNT とのヘテロ二量体である HIF-1 は、低酸素下で増殖因子を誘導する転写因子の1つであることから、低酸素により細胞の遊走や増殖が促進される可能性が考えられた。そこで通常酸素と低酸素状態での血管平滑筋細胞の遊走及び増殖について比較したところ、通常酸素下ではほとんどみられなかった細胞の遊走が低酸素により促進さ

れ [Fig. 1(B)], さらに細胞の増殖も低酸素の時間依存的に促進された [Fig. 1(C)]. これらのことから、低酸素は病巣部位で血管平滑筋細胞の遊走と増殖を引き起こす要因の1つとなることが伺え、これらには HIF-1 依存的に誘導される遊走因子と増殖因子が関わっている可能性が示唆された。

### 3. TSP-1 の細胞遊走と増殖における役割

TSP-1 は、血管平滑筋細胞の遊走と増殖に作用するとの報告があり、<sup>22,23)</sup> また通常の血管ではごくわずかな発現であるのに対して、動脈硬化病巣部位<sup>19)</sup> や血管障害<sup>24,25)</sup> 及び高血圧<sup>26)</sup> を伴う血管では高発現していることから、病的な変化に伴って増大した TSP-1 が血管平滑筋細胞になんらかの影響を与えていると考えられる。本稿では、低酸素下で誘導される数多くの増殖因子の中から特に TSP-1<sup>18)</sup> に焦点

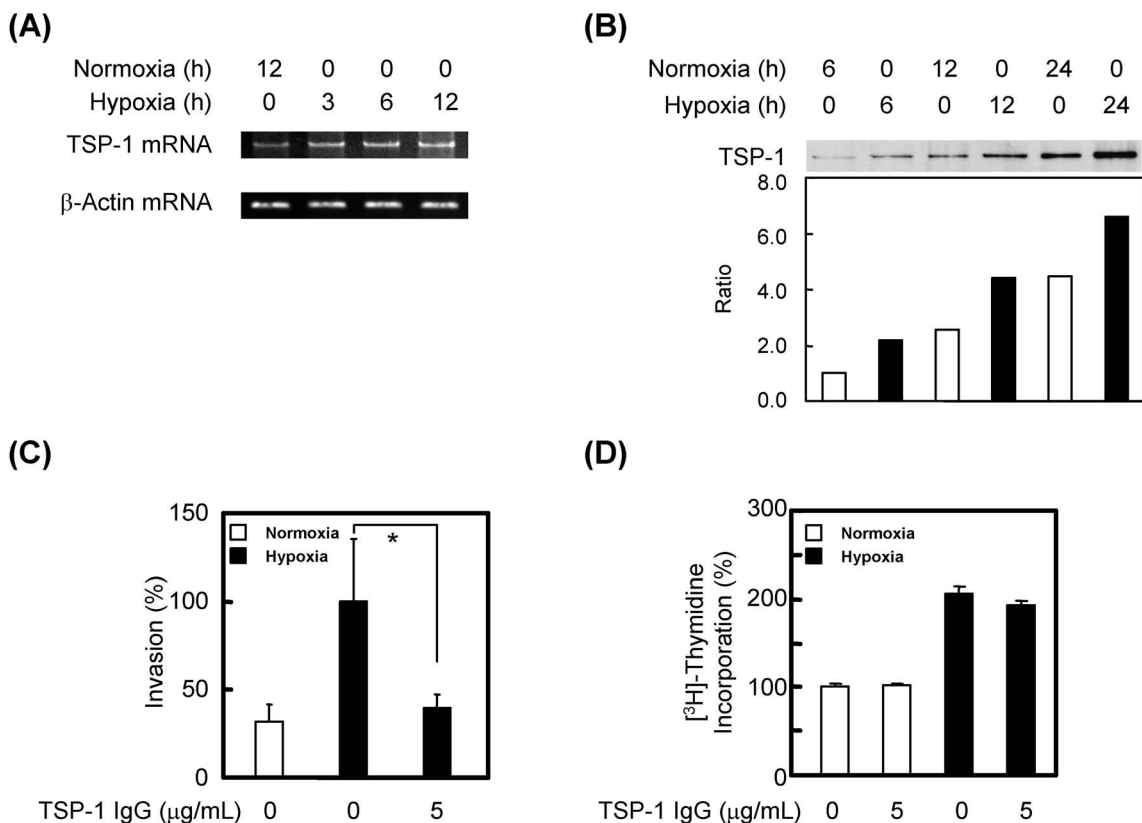


Fig. 2 The Time-dependent Expression of mRNA and Protein of TSP-1, and Effect of Anti-TSP-1 Antibody on Hypoxia-induced Migration and Proliferation in Human CSMCs

(A) CSMCs were exposed to 1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> for 3, 6 or 12 hours. The mRNA of TSP-1 and  $\beta$ -actin (as loading control) were analyzed by RT-PCR. (B) CSMCs were exposed to 1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> for 3, 6, 12 or 24 hours. Culture medium was analyzed by SDS-PAGE with 10% polyacrylamide gel and immunoblotted with anti-TSP-1 IgG. The bar in the graph represents the intensities of TSP-1 protein levels. (C) After incubation of CSMCs at 37°C for 12 hours in the presence or absence of a neutralizing antibody against TSP-1, photos of cells migrated from the upper to the lower side of the membranes were taken with a microscope, and the cell number was counted. Data are the mean  $\pm$  S.D. of six different cell preparations and expressed as a ratio of hypoxia in the absence of a neutralizing antibody for TSP-1 (TSP-1 IgG). \* $p$  < 0.05 vs. hypoxia in the absence of antibody. (D) CSMCs were incubated under normoxic or hypoxic conditions for 12 hours in the presence or absence of TSP-1 IgG. The incorporation of [<sup>3</sup>H]-thymidine was analyzed with a liquid scintillation counter. Data are the mean  $\pm$  S.D. of three different cell preparations and expressed as a ratio of normoxia in the absence of TSP-1 IgG.

を当て検索した。血管平滑筋細胞を低酸素にさらすと、TSP-1 mRNA の誘導と、そのタンパク質の細胞外への分泌の増大が認められた [Fig. 2, (A) and (B)]. さらに低酸素状態での血管平滑筋細胞の遊走は、抗 TSP-1 中和抗体で有意に阻害されたが [Fig. 2(C)], 低酸素により促進される細胞増殖は中和抗体の影響を受けなかった [Fig. 2(D)]. このことから、TSP-1 はオートクライン的に血管平滑筋細胞に作用して低酸素下での細胞の遊走のみを促進する役割を担っていると考えられた。

TSP-1 は、マトリックスタンパク質であり細胞の接着因子として働いているため、TSP-1 に含まれる様々なドメイン構造を介して細胞膜に発現する受容体のインテグリン、<sup>27-29</sup> CD36<sup>30</sup> 及び CD47 (integrin-associated protein; IAP)<sup>31</sup> と結合することが知られている [Fig. 3(A)]. これまでに TSP-1 には 4 つのインテグリン結合領域の存在が知られてお

り、インテグリン  $\alpha_v\beta_3$  及びインテグリン  $\alpha_5\beta_1$  のそれぞれが結合できるタイプ 3 リピート領域<sup>27)</sup>と、インテグリン  $\beta_1$  サブクラス ( $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$ ) が結合できる N 末端側にある独立した 3 つの領域<sup>32)</sup>がある。特に TSP-1 のタイプ 3 リピート領域の Arg-Gly-Asp (RGD) 配列は、内皮細胞や血管平滑筋細胞の接着に重要な役割を担っており、RGD ペプチドが TSP-1 とインテグリン  $\beta_3$  との結合を阻害したことからインテグリン  $\beta_3$  を介した細胞接着に重要な配列であることが明らかにされている。<sup>27)</sup> また、血管平滑筋細胞の TSP-1 によるケモタキシスが RGD ペプチドやインテグリン  $\beta_3$  の中和抗体で抑制されたことから、<sup>23)</sup> TSP-1 の RGD 配列はインテグリン  $\beta_3$  との結合を介して血管平滑筋細胞の遊走を引き起こすと考えられている。本稿では、低酸素によってインテグリン  $\beta_1$  mRNA 及び CD36 mRNA の発現は全く変化しなかったが、インテグリン  $\beta_3$

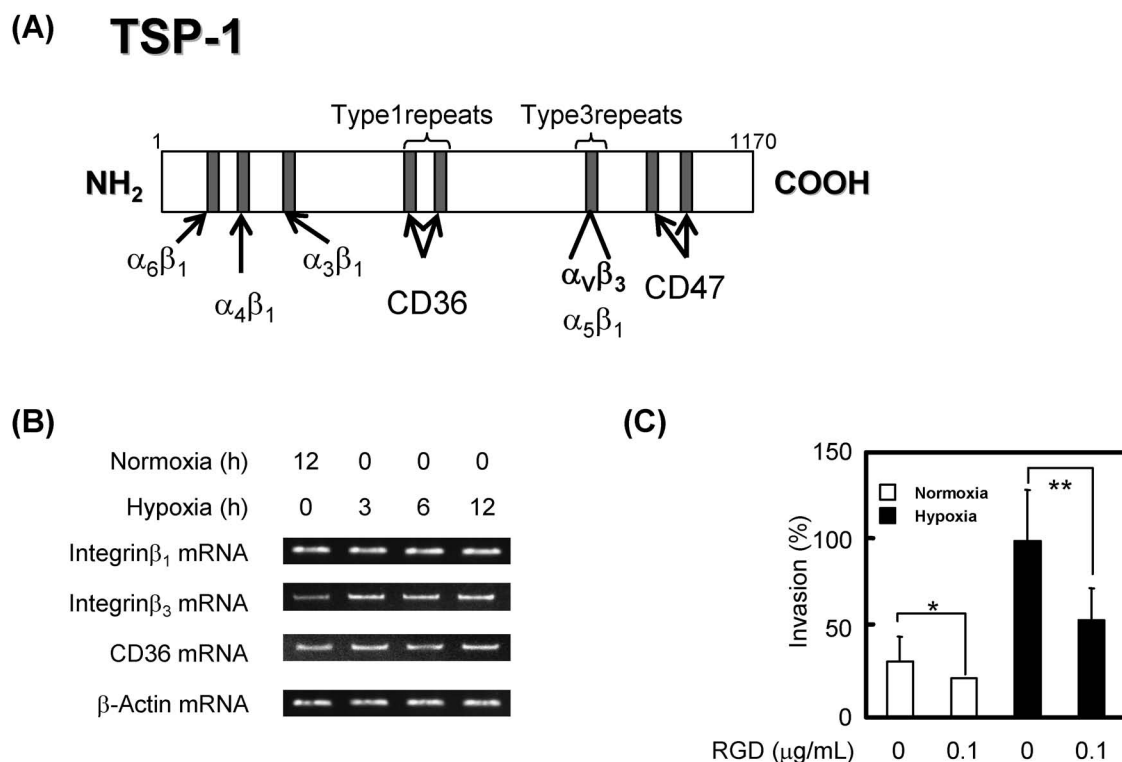


Fig. 3 The Induction of Some Receptors for TSP-1 and the Inhibition of Hypoxia-induced Migration by RGD Peptide under Hypoxic Conditions

(A) TSP-1 (170 kDa) contains some multiple domains, which interact with distinct cellular receptors. The three different domain in the N-terminal binds to integrin  $\beta_1$  subclasses. The type 1 repeats and the type 3 repeats bind to CD36, and integrin  $\alpha_v\beta_3$  and  $\alpha_5\beta_1$ , respectively. The C-terminal domain binds to CD47 identified as integrin-associated protein (IAP). (B) CASMCs were exposed to 1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> for 3, 6 or 12 hours. The mRNA of integrin  $\beta_1$ , Integrin  $\beta_3$  and CD36 as a receptor for TSP-1 were analyzed by RT-PCR. (C) After incubation of CASMCs at 37°C for 12 hours in the presence or absence of RGD peptide, photos of cells migrated from the upper to the lower side of the membranes were taken with a microscope, and the cell number was counted. Data are the mean  $\pm$  S.D. of six different cell preparations and expressed as a ratio of hypoxia in the absence of RGD peptide. \* $p < 0.05$  vs. normoxia in the absence of RGD peptide, and \*\* $p < 0.005$  vs. hypoxia in the absence of RGD peptide.

mRNA の発現は時間依存的に増大し [Fig. 3(B)], また低酸素による細胞の遊走が, インテグリン RGD ペプチドにより抑制されることが示された [Fig. 3(C)]. このことから, TSP-1 のタイプ 3 リピート領域がインテグリン  $\beta_3$  を介して血管平滑筋細胞の遊走に関与しており, 低酸素による TSP-1

とインテグリン  $\beta_3$  の発現誘導によりそれらの相互作用が増強して細胞遊走の促進を引き起こす可能性が考えられた.

4. HIF-1 $\alpha$  発現抑制細胞における細胞の遊走

低酸素下での血管平滑筋細胞の遊走は, TSP-1 の発現が引き金となることが示唆されたことから,

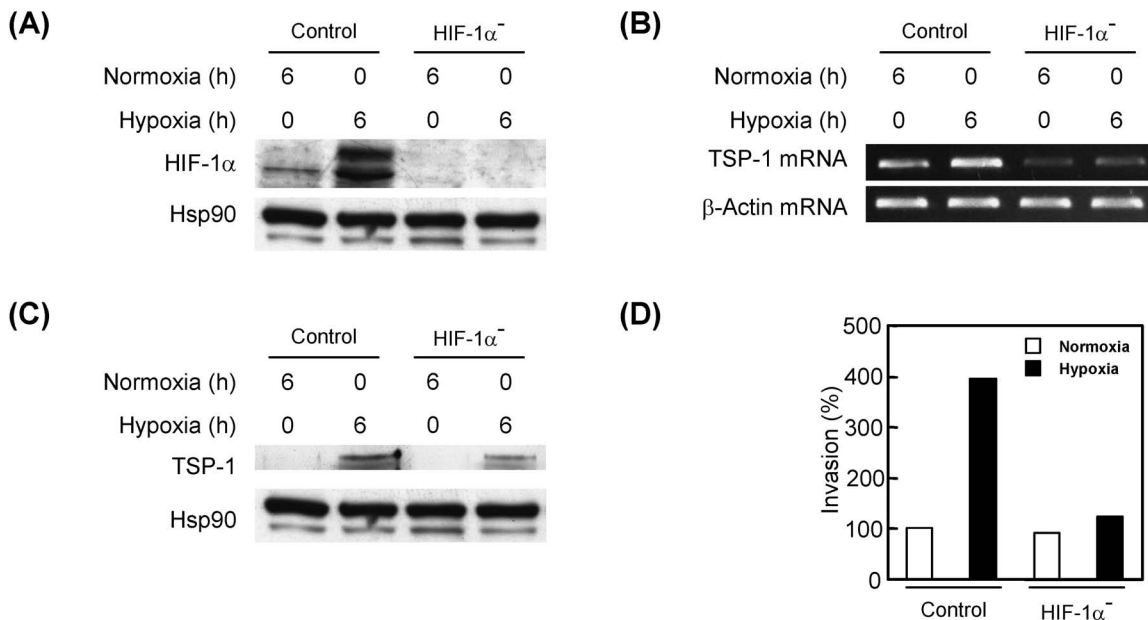


Fig. 4 The Expression of TSP-1 and Migration in HIF-1 $\alpha$ -knockdown CASMCs

HIF-1 $\alpha$ -antisense plasmid was transiently transfected in CASMCs to prepare HIF-1 $\alpha$ -knockdown cells (HIF-1 $\alpha^-$ ). HIF-1 $\alpha^-$  cell were exposed to 1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> for 6 hours. (A) Whole cell lysates were analyzed by SDS-PAGE with 7.5% polyacrylamide gel and immunoblotted with anti-HIF-1 $\alpha$  and anti-Hsp90 (as loading control) antibodies. (B) The mRNA of TSP-1 and  $\beta$ -actin (as loading control) were analyzed by RT-PCR. (C) Culture medium was analyzed by SDS-PAGE with 10% polyacrylamide gel and immunoblotted with anti-TSP-1 IgG. (D) HIF-1 $\alpha^-$  cells were exposed to 1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> for 12 hours. After incubation of HIF-1 $\alpha^-$  or control cells at 37°C for 12 hours, photos of cells migrated from the upper to the lower side of the membranes were taken with a microscope and the cell number was counted. Data are expressed as a ration of normoxia in the control cells.

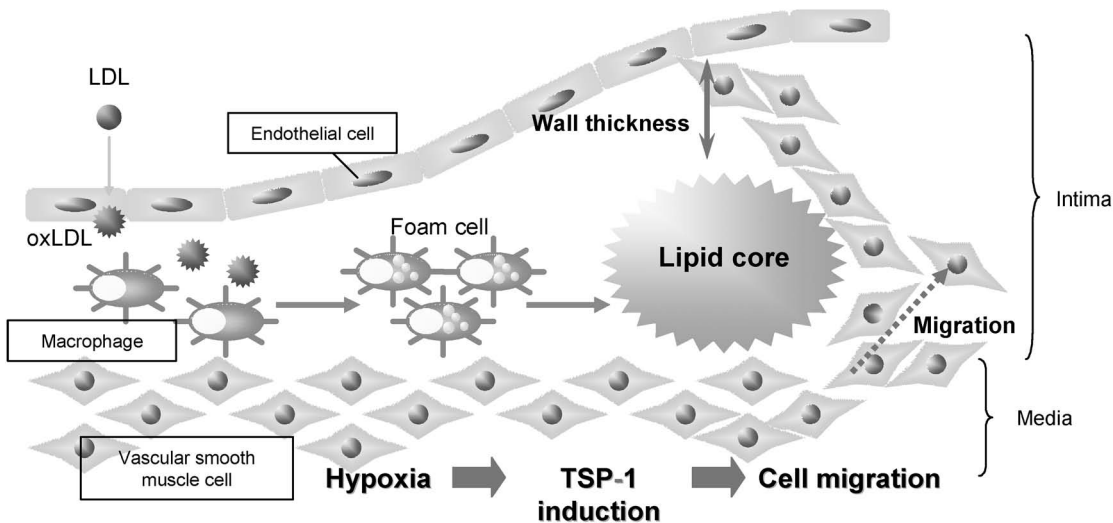


Fig. 5 Schematic Model of Atherosclerosis

Hypoxia in atherosclerotic lesions promotes the migration of VSMCs to the intima via TSP-1 expression. The rapid uptake of oxidized LDL (oxLDL) by macrophages leads to the formation of foam-cells, of which the death by apoptosis or necrosis forms lipid core. Thus, atherosclerotic plaques are developed.

TSP-1 の発現制御に係わる動脈硬化を進展させる因子の1つとして HIF-1 が考えられる。このことを HIF-1 $\alpha$  発現抑制細胞 (HIF-1 $\alpha$ <sup>-</sup>) を用いて検索した結果、低酸素による HIF-1 $\alpha$  の安定化や TSP-1 mRNA 及びタンパク質の誘導はみられず [Fig. 4 (A)–(C)], 低酸素による細胞の遊走もほとんど生じなかった [Fig. 4 (D)]. 従来、低酸素により TSP-1 が誘導されることが知られていたが,<sup>18)</sup> TSP-1 の発現に HIF-1 が関与するかは不明であった。HIF-1 $\alpha$  発現抑制細胞の結果から、その関与が示唆された。これらのことから、低酸素下での血管平滑筋細胞の遊走は、HIF-1 依存的に誘導された TSP-1 による可能性が示唆され、動脈硬化巣での低酸素領域で発現する HIF-1 $\alpha$  が病巣の内膜肥厚を制御する因子の1つであると考えられる。

### 5. おわりに

低酸素は血管平滑筋細胞の増殖と遊走に関与し、特に遊走は HIF-1 依存的に誘導される TSP-1 により引き起こされている可能性が示された。したがって、動脈硬化病巣での内膜肥厚に低酸素及び TSP-1 の関与が示唆された (Fig. 5)。これまでにラットでみられる血管障害に伴う内膜肥厚が、TSP-1 の抗体を投与しておくことで抑制されるとの報告があり,<sup>33)</sup> 内皮細胞の障害に伴う内膜肥厚も、TSP-1 による血管平滑筋細胞の遊走作用が考えられる。これらのことから、血管での内膜肥厚を抑制する新しい治療のターゲット因子として HIF-1 $\alpha$  及び TSP-1 が示唆された。

### REFERENCES

- 1) Bjornheden T., Levin M., Evaldsson M., Wiklund O., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **19**, 870–876 (1999).
- 2) Wang G. L., Jiang B. H., Rue E. A., Semenza G. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 5510–5514 (1995).
- 3) Kallio P. J., Okamoto K., O'Brien S., Carrero P., Makino Y., Tanaka H., Poellinger L., *EMBO J.*, **17**, 6573–6586 (1998).
- 4) Ivan M., Kondo K., Yang H., Kim W., Valiando J., Ohh M., Salic A., Asara J. M., Lane W. S., Kaelin Jr. W. G., *Science*, **292**, 464–468 (2001).
- 5) Jaakkola P., Mole D. R., Tian Y. M., Wilson M. I., Gielbert J., Gaskell S. J., Kriegsheim A., Hestrestreit H. F., Mukherji M., Schofield C. J., Maxwell P. H., Pugh C. W., Ratcliffe P. J., *Science*, **292**, 468–472 (2001).
- 6) Katschinski D. M., Le L., Heinrich D., Wagner K. F., Hofer T., Schindler S. G., Wenger R. H., *J. Biol. Chem.*, **277**, 9262–9267 (2002).
- 7) Osada M., Imaoka S., Funae Y., *FEBS Lett.*, **575**, 59–63 (2004).
- 8) Richard D. E., Berra E., Gothie E., Roux D., Pouyssegur J., *J. Biol. Chem.*, **274**, 32631–32637 (1999).
- 9) Berra E., Milanini J., Richard D. E., Le Gall M., Vinals F., Gothie E., Roux D., Pages G., Pouyssegur J., *Biochem. Pharmacol.*, **60**, 1171–1178 (2000).
- 10) Minet E., Arnould T., Michel G., Roland I., Mottet D., Raes M., Remacle J., Michiels C., *FEBS Lett.*, **468**, 53–58 (2000).
- 11) Salceda S., Beck I., Caro J., *Arch. Biochem. Biophys.*, **334**, 389–394 (1996).
- 12) Eguchi H., Ikuta T., Tachibana T., Yoneda Y., Kawajiri K., *J. Biol. Chem.*, **272**, 17640–17647 (1997).
- 13) Semenza G., *Biochem. Pharmacol.*, **64**, 993–998 (2002).
- 14) Osada-Oka M., Akiba S., Sato T., “Trends in Cellular Signaling,” ed. by Caplin D. E., Nova Science Publishers, New York, 2006, pp. 111–141.
- 15) Adair T. H., Gay W. J., Montani J. P., *Am. J. Physiol.*, **259**, R393–404 (1990).
- 16) Melin J., Hellberg O., Akyurek L. M., Kallskog O., Larsson E., Fellstrom B. C., *Kidney Int.*, **52**, 985–991 (1997).
- 17) Sano M., Minamino T., Toko H., Miyauchi H., Orimo M., Qin Y., Akazawa H., Tateno K., Kayama Y., Harada M., Shimizu I., Asahara T., Hamada H., Tomita S., Molckentin J. D., Zou Y., Komuro I., *Nature*, **446**, 444–448 (2007).
- 18) Phelan M. W., Forman L. W., Perrine S. P., Faller D. V., *J. Lab. Clin. Med.*, **132**, 519–529 (1998).
- 19) Riessen R., Kearney M., Lawler J., Isner J. M., *Am. Heart J.*, **135**, 357–364 (1998).
- 20) Jawien A., Bowen-Pope D. F., Lindner V., Schwartz S. M., Clowes A. W., *J. Clin. Invest.*, **89**, 507–511 (1992).

- 21) Klagsbrun M., Edelman E. R., *Arteriosclerosis*, **9**, 269–278 (1989).
- 22) Lymn J. S., Patel M. K., Clunn G. F., Rao S. J., Gallagher K. L., Hughes A. D., *J. Cell Sci.*, **115**, 4353–4360 (2002).
- 23) Patel M. K., Lymn J. S., Clunn G. F., Hughes A. D., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **17**, 2107–2114 (1997).
- 24) Raugi G. J., Mullen J. S., Bark D. H., Okada T., Mayberg M. R., *Am. J. Pathol.*, **137**, 179–185 (1990).
- 25) Sajid M., Hu Z., Guo H., Li H., Stouffer G. A., *J. Investig. Med.*, **49**, 398–406 (2001).
- 26) Botney M. D., Kaiser L. R., Cooper J. D., Mecham R. P., Parghi D., Roby J., Parks W. C., *Am. J. Pathol.*, **140**, 357–364 (1992).
- 27) Lawler J., Weinstein R., Hynes R. O., *J. Cell Biol.*, **107**, 2351–2361 (1988).
- 28) Yabkowitz R., Dixit V. M., Guo N., Roberts D. D., Shimizu Y., *J. Immunol.*, **151**, 149–158 (1993).
- 29) Chandrasekaran S., Guo N. H., Rodrigues R. G., Kaiser J., Roberts D. D., *J. Biol. Chem.*, **274**, 11408–11416 (1999).
- 30) Dawson D. W., Pearce S. F., Zhong R., Silverstein R. L., Frazier W. A., Bouck N. P., *J. Cell Biol.*, **138**, 707–717 (1997).
- 31) Gao A. G., Lindberg F. P., Finn M. B., Blystone S. D., Brown E. J., Frazier W. A., *J. Biol. Chem.*, **271**, 21–24 (1996).
- 32) Calzada M. J., Sipes J. M., Krutzsch H. C., Yurchenco P. D., Annis D. S., Mosher D. F., Roberts D. D., *J. Biol. Chem.*, **278**, 40679–40687 (2003).
- 33) Chen D., Asahara T., Krasinski K., Witzenchler B., Yang J., Magner M., Kearney M., Frazier W. A., Isner J. M., Andres V., *Circulation*, **100**, 849–854 (1999).