

Des- γ -carboxy prothrombin は血管内皮細胞の増殖能と移動能を亢進させる

藤川 達也, 白羽 英則*, 山本 和秀

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 消化器・肝臓内科学

キーワード：異常プロトロンビン, 肝細胞癌, VEGF レセプター-2 (KDR), 血管内皮細胞, シグナル伝達

Des- γ -carboxy prothrombin-promoted vascular endothelial cell proliferation and migration

Tatsuya Fujikawa, Hidenori Shiraha*, Kazuhide Yamamoto

Department of Gastroenterology and Hepatology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

緒 言

肝臓に発生する悪性腫瘍の中で肝細胞癌（HCC）は頻度が高く、予後不良である。年間死亡者数は国内で3万人以上¹⁾、全世界では50万人を超え²⁾、HCCの腫瘍進展を抑制する治療法の開発は急務である。一般にHCCは血管豊富な腫瘍で、その進展は新生血管の発育と深い関連があり³⁻⁶⁾、近年の分子標的薬開発により腫瘍血管新生を制御する治療法が癌治療のひとつの現実的な新規治療法となりつつある⁷⁾。様々な癌において、新生腫瘍血管を制御する治療法として、直接血管内皮細胞を標的とする方法の他に、腫瘍細胞や間葉細胞などから放出される血管増殖因子を標的とした治療法が開発されつつある⁸⁾。しかしながらHCCにおける血管新生因子の役割は未だ十分に解明されておらず、HCC

進展の血管新生スイッチを制御するための標的分子の同定は肝要である。

血管内皮増殖因子（VEGF）は細胞増殖、細胞移動、血管内皮細胞の形態変化において重要な役割を示す⁹⁻¹³⁾。しかしながら、VEGFや肝細胞増殖因子（HGF）以外にも多数の因子がHCCの血管新生に関与している¹⁴⁻¹⁷⁾。Des- γ -carboxy prothrombin（DCP）は、HCCの有用な腫瘍マーカーとして知られている¹⁸⁻²²⁾。我々はDCPがHCCにおける自己分泌型増殖因子でありHCC培養細胞の細胞増殖能をMet-Janus kinase 1-signal transducer and activator of transcription 3（Met-Jak1-Stat3）シグナル伝達経路を介して亢進させることを報告した²³⁾。さらにDCP陽性のHCCでは、バリエーション GGCX 遺伝子がDCP産生に関与している可能性を報告した²⁴⁾。臨床データの検討においてもDCPはHCCの予後因子となりうること、血清中および組織中のDCP発現はHCCの腫瘍血管増生と強い相関を有するとの報告がある²⁵⁾。我々はDCPがHCCから分泌されparacrineに血管内皮細胞に作用する因子であると仮説をたて研究を遂行した。その結

平成21年2月受理

*〒700-8558 岡山市鹿田町2-5-1

電話：086-235-7219 FAX：086-225-5991

E-mail：hshiraha@md.okayama-u.ac.jp

プロフィール



藤川達也

昭和49年2月12日生

平成10年3月 岡山大学医学部卒業

平成18年6月 岡山大学大学院医学研究科修了

平成18年7月 岡山大学医学部客員研究員

平成18年8月 ハーバード医科大学附属ベイスイスラエルデーコネス病院医学科内分泌学教室リサーチフェロー

平成20年4月 岡山大学医学部客員研究員

現在に至る

果, DCP が HCC に対する直接的作用のみならず, ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の細胞増殖能及び細胞移動能を亢進させることが解明された. また DCP の血管内皮細胞におけるシグナル伝達経路の同定では, DCP が VEGF receptor 2 (KDR) に結合して KDR の自己リン酸化をもたらし, 更に下流の因子である PLC- γ や MAPK もリン酸化させることが判明した.

DCP は HCC 培養細胞に対して細胞増殖効果をもたらす

HCC 培養細胞 (Hep3B, SK-Hep1) を用いた細胞増殖能の検討では, 抗体を用いたアフィニティクロマトグラフィにより精製し, 純度を確認した DCP の添加により細胞増殖能が 1.5~2.1 倍へと亢進した²³⁾. Prothrombin (PT) および異常 PT である DCP の構造には 2 つのクリングルドメイン構造が存在し, この構

造は肝細胞増殖因子 (HGF) に類似している (図 1 A). DCP が HGF 類似の構造を有することから HGF レセプターである Met へ DCP が結合するか否かを検討し, DCP と Met の直接的結合を確認した. さらに DCP は Met の 1234 番目のチロシンリン酸化を介して Met-JAK-STAT シグナル伝達経路を活性化することが判明した. この現象は DCP 陽性の HCC は, DCP 陰性の HCC と比較して増殖が早く予後が悪いとの臨床検討の報告を説明しうるものと考えられる.

DCP 陽性の HCC では GGCX 遺伝子に exon skipping を認める

PT および DCP はその N 末端に 41 個のアミノ酸残基からなる Gla ドメインを有している. PT 前駆体では Gla ドメインにグルタミン酸残基 (Glu) が 10 個存在するが, これらはビタミン K 存在下で γ カルボキシグルタミン酸 (Gla) に変換され, 凝固活性を有する PT が合成される (図 1 B). HCC により DCP が産生される機序は, Glu を Gla に変換する酵素である γ グルタミルカルボキシラーゼ (GGCX) の活性低下によるものと考えられているが²⁶⁾, その正確なメカニズムはこれまで明らかではなかった. 我々は exon 2 スキップを起こしたバリエント GGCX 遺伝子発現が HCC の DCP 産生能, また細胞増殖能を制御している可能性が高いことを報告している²⁴⁾ (図 2). Exon 2 は GGCX 蛋白質の第一膜貫通領域をコードし, その skipping は GGCX 蛋白質の構造変化をもたらす可能性がある²⁷⁾. また GGCX 蛋白質の構造変化はビタミン K エポキシド還元酵素の結合領域などに影響を与えて HCC 培養細胞の DCP 産生に影響をもたらす可能性も考えられ

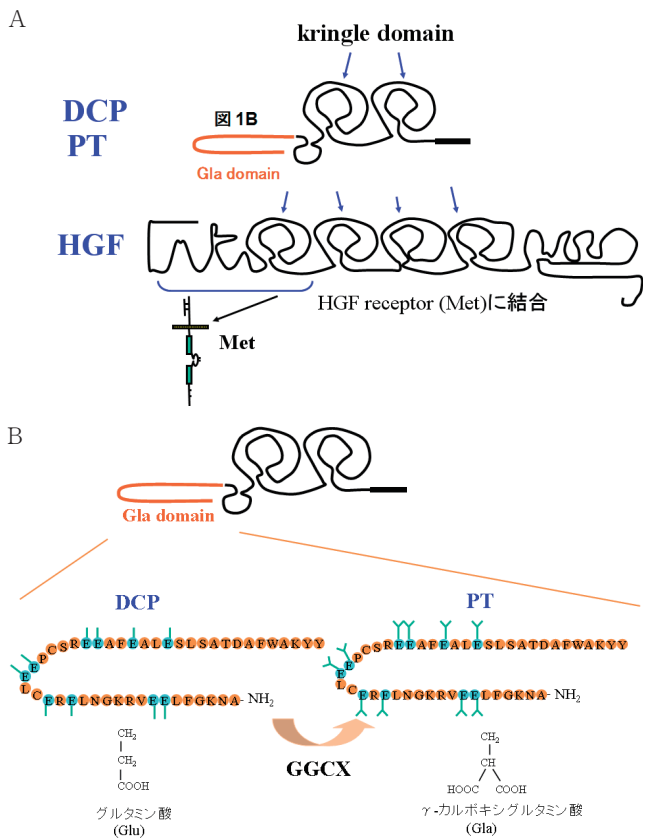


図 1 PT, DCP, HGF の構造
(A) PT, DCP の構造には 2 つのクリングルドメイン構造が存在し, この構造は肝細胞増殖因子 (HGF) に類似している.
(B) PT は Gla ドメインに 10 個の γ カルボキシグルタミン酸 (Gla) を有するのに対し, DCP が有する Gla は 9 個以下である.

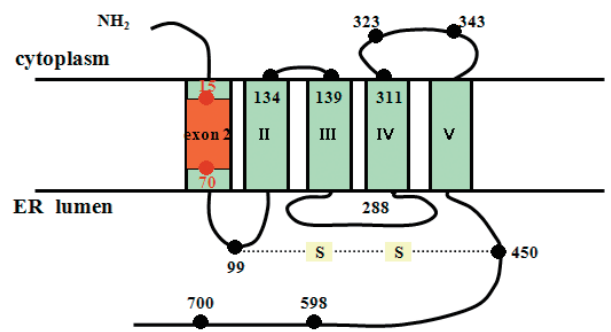


図 2 DCP 産生性 HCC の GGCX exon 2 skipping
DCP 産生性 HCC では, exon2 の skipping がみられる. exon2 は GGCX 蛋白質の第一膜貫通領域をコードするので構造変化が起こり活性低下を引き起こしている可能性が高い.

る²⁸⁻³¹⁾。

DCP は血管内皮細胞に対して細胞増殖効果，細胞移動能亢進作用を示す

HCC は，血流に富む血管の豊富な癌として知られている。DCP が HCC 培養細胞に対して細胞増殖作用を有するが²³⁾，DCP の血管新生に対する paracrine 作用を有するか否かをヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いて検討した。培養細胞 HUVEC において DCP は濃度依存性に細胞増殖能の指標である [³H]-thymidine の取り込み能を上昇させた。一方で PT は DCP と等しい濃度において [³H]-thymidine 取り込み能を上昇させなかった (図 3 A)。また，*in vitro* wound healing 法で細胞移動能を評価したところ，

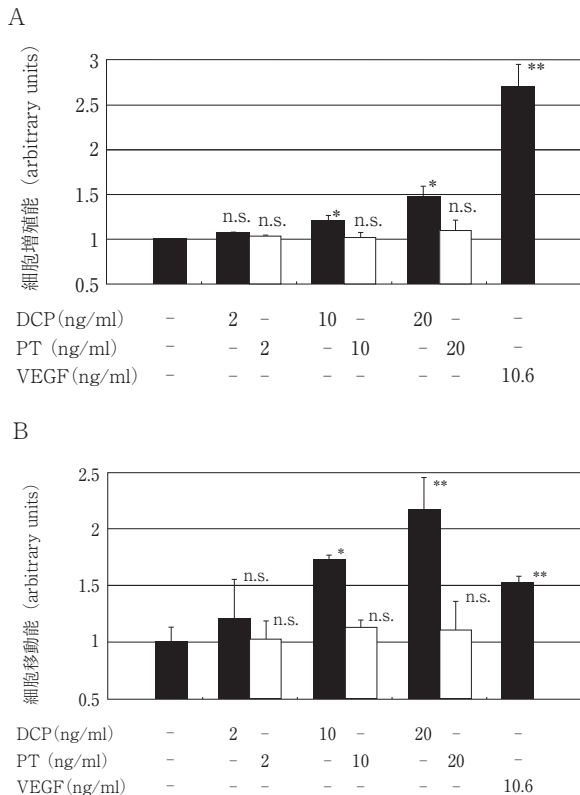


図 3 HUVEC における DCP の細胞増殖能，細胞移動能に与える影響

(A) HUVEC を PT (2 or 20ng/ml)，DCP (2 or 20ng/ml)，VEGF (10.6ng/ml) で 18 時間刺激して細胞増殖能を [³H]-thymidine 取り込み能で検討した。(B) HUVEC を PT (2 or 20ng/ml)，DCP (2 or 20ng/ml)，VEGF (10.6ng/ml) で 24 時間刺激して細胞移動能を *in vitro* wound healing 法で検討した。データは刺激を加えていない細胞を 1.0 とした比率で示し，3 回以上の検討における mean ± S.E. をデータ値とした。

($p < 0.05$ ， $**p < 0.01$ ，n.s.，not significant) (文献 35 より引用)

DCP は濃度依存性に細胞移動能を亢進させたが，PT は DCP と等しい濃度においても細胞移動能を亢進させなかった (図 3 B)。

DCP は血管内皮細胞の KDR-PLC- γ -MAPK シグナル伝達経路を活性化させることにより，細胞増殖能，細胞移動能を亢進させる

HCC の培養細胞においては，DCP は Hep3B の細胞表面レセプター Met に結合して Met の自己リン酸化，さらにその下流の Jak1-Stat3 シグナル伝達経路の活性化を引き起こすが，HUVEC を用いた検討では，DCP は Met-Jak1-Stat3 シグナル伝達経路への影響は認められなかった。そこで HUVEC において，DCP によって活性化されるレセプターを同定するためにレセプターチロシンキナーゼ抗体アレイを用いた検討を行った。アレイには，レセプター型チロシンキナーゼやそのシグナル関連分子 (Met，VEGF レセプター，EGF レセプター，FGF レセプター，PDGF レセプター，インシュリンレセプター等) の抗体が含まれておりリン酸化も同時に検討できる。アレイ検討の結果，DCP は KDR をリン酸化することが判明したが，PT は KDR をリン酸化しなかった (図 4)。DCP のシグナル伝達経路の検討では，DCP と KDR の直接的結合は免疫沈降法で確認された (図 5 A)。また DCP の刺激は HUVEC の KDR 自己リン酸化をもたらししていた (図 5 B)。

KDR はそのリガンドである VEGF に活性化されると，特異的チロシン残基が自己リン酸化される³²⁻³⁴⁾。

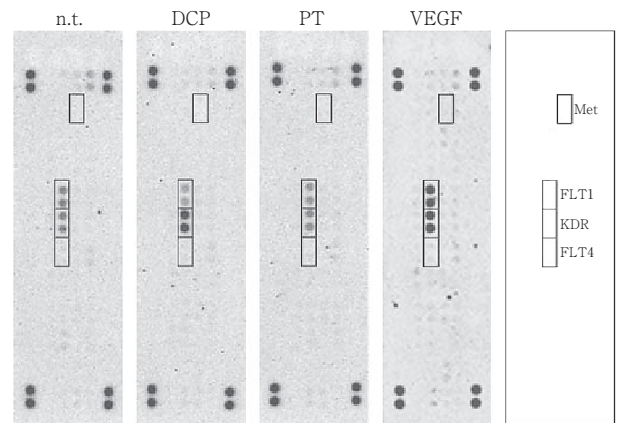


図 4 レセプターチロシンキナーゼ抗体アレイを用いた検討 HUVEC を DCP (20ng/ml)，PT (20ng/ml)，VEGF (10.6ng/ml) で 15 分間刺激した。反応は chemiluminescence 法で検出した。(文献 35 より引用)

KDR の活性化により, PLC- γ が C 末端の SH2 ドメインを介して KDR に結合し, さらに活性化された PLC- γ によりプロテインキナーゼ C が刺激され raf-MEK-MAPK シグナル伝達経路の刺激へとつながる³⁴). Western blot による検討では, DCP で刺激した HUVEC において KDR, PLC- γ , MAPK はリン酸化を受けたが, PT による刺激ではリン酸化は認められなかった (図 5 B-D). HUVEC における DCP 依存性の増殖能は, KDR 阻害剤により $93 \pm 14\%$, MEK 阻害剤により $79 \pm 14\%$ それぞれ阻害された (図 6 A). *in vitro* wound healing 法による細胞移動能の検討では DCP 依存性の移動能は, KDR 阻害剤により $104 \pm 2\%$, MEK 阻害剤により $102 \pm 12\%$ それぞれ阻害された (図 6 B). KDR に対する siRNA は, DCP 依存性細胞増殖

能を $115 \pm 17\%$ (図 7 A), 細胞移動能を $110 \pm 24\%$ 阻害した (図 7 B).

考 察

臨床研究においては, 血清 DCP 濃度と臨床的な HCC の血管新生とは有意な相関がある²⁵). 我々は DCP の血管内皮細胞に対する直接的な細胞増殖効果, 細胞移動効果を証明した³⁵). HCC 培養細胞において, DCP は細胞増殖効果を Met-Jak1-Stat3 シグナル伝達経路を介してもたすが, 血管内皮細胞 HUVEC においては同シグナル経路の明らかな活性化は認められなかった. Met は細胞が増殖していない安定状態で, かつ集密状態の内皮細胞では発現がほとんど確認されないと

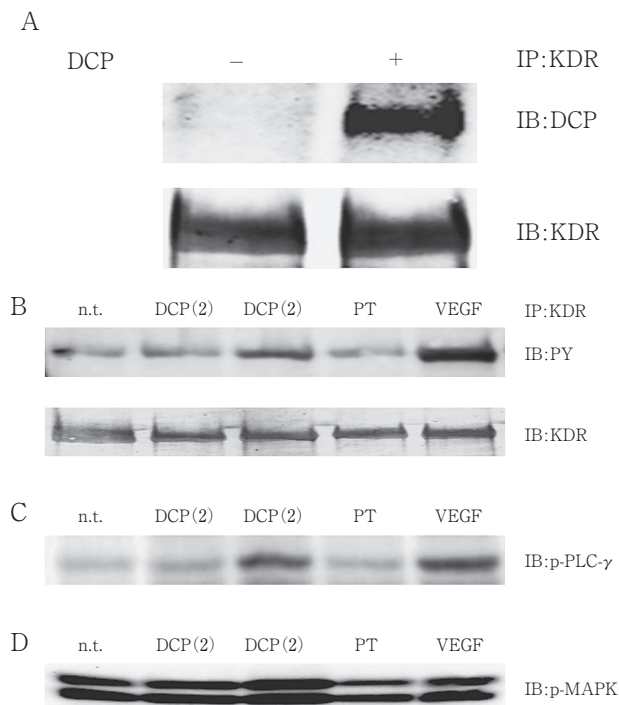
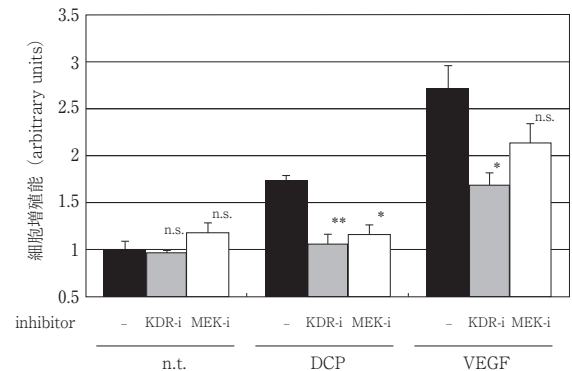


図 5 DCP と KDR の共免疫沈降 (A) および KDR (B), PLC- γ (C), MAPK (D) のリン酸化の検討

(A) HUVEC を DCP (20 ng/ml) で 15 分刺激して, セルライゼートから免疫沈降法によって KDR 蛋白質を得た. 沈降体は抗 DCP, 抗 KDR 抗体を用いて western blot で解析した. (B-D) HUVEC を DCP (2 or 20 ng/ml), PT (20 ng/ml), VEGF165 (10.6 ng/ml) で 15 分間刺激した. B, セルライゼートから免疫沈降法によって KDR 蛋白質を得て, 抗チロシンリン酸化抗体と抗 KDR 抗体を用いて western blot で解析した. C, D, セルライゼートは抗リン酸化 PLC- γ 抗体 (Tyr-771) (C), 抗リン酸化 MAPK 抗体 (Thr-202/204) (D) を用いて western blot で解析した. (IP, immunoprecipitation; IB, immunoblot; n.t., nontreated control) (文献35より引用)

A



B

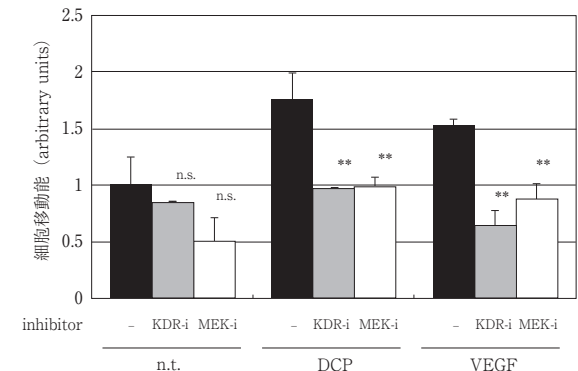


図 6 KDR カイネース阻害剤および MAPK シグナル伝達経路阻害剤が DCP 依存性の細胞増殖能 (A) および細胞移動能 (B) に及ぼす影響

KDR カイネース阻害剤である ZM323881 (2 nM) または MEK 阻害剤である PD98059 (4 μ M) 存在下で HUVEC の [³H]-thymidine 取り込み能 (A), *in vitro* wound healing 法 (B) を測定した. 結果は刺激を与えていない細胞の結果を 1.0 とした比率で示し, 3 回以上の検討における mean \pm S.E. をデータ値とした. (p < 0.05, ** p < 0.01, n.s., not significant) (n.t., nontreated control; KDR-i, KDR kinase inhibitor; MEK-i, MEK inhibitor) (文献35より引用)

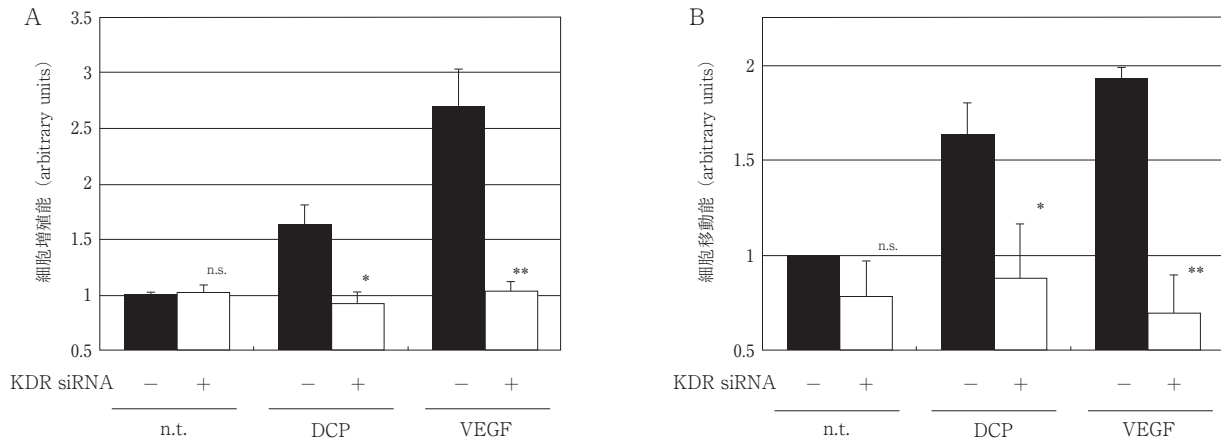


図7 KDR に対する siRNA が DCP 依存性の細胞増殖能 (A) および細胞移動能 (B) に及ぼす影響
KDR に対する siRNA で HUVEC を処理した後に ^3H -thymidine 取り込み能 (A), *in vitro* wound healing 法 (B) を測定した。結果は刺激を与えていない細胞の結果を1.0とした比率で示し、3回以上の検討における mean \pm S.E. をデータ値とした。(p<0.05, **p<0.01, n.s., not significant) (n.t., nontreated control) (文献35より引用)

いう報告がある³⁶⁾。今回の検討で用いた HUVEC では *in vivo* の状態における内皮細胞に比べ Met の発現が強く抑えられている可能性が考えられる。

DCP は HCC に Met-Jak1-Stat3 シグナル伝達経路を介して刺激を与えるのに対して HUVEC に対しては異なる細胞表面レセプター KDR を通じて刺激を与える。DCP は、HCC 細胞と血管内皮細胞でそれぞれ異なるレセプターと結合する。単一のリガンドが環境に応じて異なるレセプターを利用する現象は、他にも報告があり、Bag-1 が Met と血小板由来増殖因子レセプター (PDGFR) に結合し、シグナル刺激を伝達させる例が報告されている³⁷⁾。HCC は血管豊富な腫瘍として知られており腫瘍発育が進むにつれて門脈よりも動脈から栄養を供給される³⁸⁾。数多く存在する血管新生因子の中でも内皮細胞増殖因子である VEGF は HCC などの悪性腫瘍の血管新生に関与しているとの報告が多数あり^{11,14,39-42)}、血管新生作用を考える上で欠かすことができない。今回の検討で KDR-PLC- γ -MAPK シグナル伝達経路は VEGF のみならず DCP によっても活性化されていたことより、DCP 刺激により HUVEC が VEGF を分泌しているという仮説も考えられる。VEGF は VEGF-A, B, C, D 等のサブタイプに分けられる⁴³⁾。いずれのサブタイプとも内皮細胞に増殖をもたらすが、KDR のみを刺激するサブタイプは存在しない⁴⁴⁾。すなわち DCP が HUVEC に VEGF サブタイプのいずれかを内因性に分泌させるならば、KDR のみならず他の VEGF レセプターも刺激されると考えら

れる。しかし抗体アレイの結果においてポジティブコントロールとして用いられた DCP と等モル濃度で用いられた VEGF-A の刺激では FLT1 と KDR のリン酸化がともにみられているのに対し、DCP の刺激では KDR のリン酸化のみである。Western blot による結果においても HUVEC を DCP で刺激しても VEGF-A, C, D の内因性分泌は認められなかった(データ未掲載)。DCP 依存性の KDR 自己リン酸化は5分後および15分後の反応として確認されているが、内因性 VEGF 分泌が誘導される時間としては早すぎる。これら結果より DCP が直接 KDR に刺激をもたらしていると結論づけた。DCP の KDR への直接的結合が、共免疫沈降法で証明できた(図5A)こともこの仮説を否定する結果となった。以上の検討、考察より、DCP の血管内皮細胞 HUVEC における主要なシグナル伝達経路は KDR-PLC- γ -MAPK シグナル伝達経路であると考えられる(図8)。

今回の検討では我々は培養細胞として HUVEC を用いたが、VEGF は肝類洞内皮細胞に対して HUVEC とは異なるシグナルを伝えるとの報告もある⁴⁵⁾。この報告の中で肝類洞内皮細胞と HUVEC の反応性は KDR シグナル伝達においては保存されていることが示されており、HCC 進展においても DCP が内皮細胞増殖、移動における重要な刺激因子となりうるという仮説に矛盾しない。

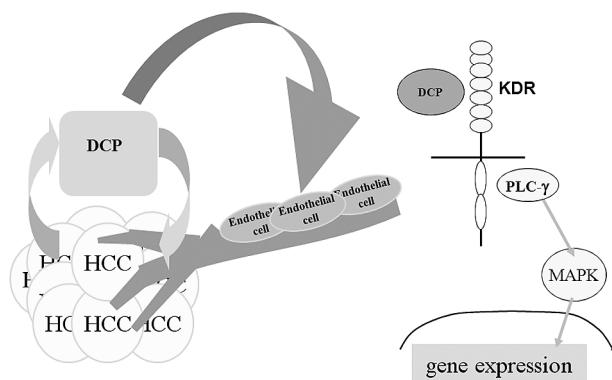


図8 DCP は HCC に対する直接的増殖作用のみならず，KDR-PLC- γ -MAPK signaling pathway を介して血管内皮細胞の細胞増殖能及び細胞移動能を亢進させる

終わりに

DCP は HCC に対する直接的増殖作用のみならず，血管内皮細胞の細胞増殖能及び細胞移動能を亢進させることにより HCC 進展に血管新生という形でも寄与していることが示唆された。今後，DCP の血管新生における病態生理学的機能の更なる検討が必要とされる。

謝 辞

本研究の遂行ならびに本論文を作成するにあたり御指導を賜りました白鳥康史先生に，またデータを提供していただきました鈴木真由美先生，上田直樹先生に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) Omata M : Modalities of prevention of recurrence after tumor ablation/resection of HCC. *J Gastroenterol Hepatol* (2004) 19, S270.
- 2) World Health Organization : Mortality database. WHO statistical information system. <http://www.who.int/whosis/> (Accessed July 2008).
- 3) Park YN, Kim YB, Yang KM, Park C : Increased expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in the early stage of multistep hepatocarcinogenesis. *Arch Pathol Lab Med* (2000) 124, 1061-1065.
- 4) Poon RT, Ng IO, Lau C, Zhu LX, Yu WC, Lo CM, Fan ST, Wong J : Serum vascular endothelial growth factor predicts venous invasion in hepatocellular carcinoma : a prospective study. *Ann Surg* (2001) 233, 227-235.
- 5) Roncalli M, Roz E, Coggi G, Di Rocco MG, Bossi P, Minola E, Gambacorta M, Borzio M : The vascular profile of regenerative and dysplastic nodules of the cirrhotic liver : implications for diagnosis and classification. *Hepatology* (1999) 30, 1174-1178.
- 6) Terada T, Nakanuma Y : Arterial elements and perisinusoidal cells in borderline hepatocellular nodules and small hepatocellular carcinomas. *Histopathology* (1995) 27, 333-339.
- 7) Sugimachi K, Tanaka S, Terashi T, Taguchi K, Rikimaru T : The mechanisms of angiogenesis in hepatocellular carcinoma : angiogenic switch during tumor progression. *Surgery* (2002) 131, S135-141.
- 8) Jain RK, Duda DG, Clark JW, Loeffler JS : Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. *Nat Clin Pract Oncol* (2006) 3, 24-40.
- 9) Millauer B, Witzmann-Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NP, Risau W, Ullrich A : High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* (1993) 72, 835-846.
- 10) Guo D, Jia Q, Song HY, Warren RS, Donner DB : Vascular endothelial cell growth factor promotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contain SH2 domains. Association with endothelial cell proliferation. *J Biol Chem* (1995) 270, 6729-6733.
- 11) Ferrara N : Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis : therapeutic implications. *Semin Oncol* (2002) 29, 10-14.
- 12) Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J : The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* (2003) 9, 669-676.
- 13) Zisch AH, Schenk U, Schense JC, Sakiyama-Elbert SE, Hubbell JA : Covalently conjugated VEGF-fibrin matrices for endothelialization. *J Control Release* (2001) 72, 101-113.
- 14) Moon WS, Rhyu KH, Kang MJ, Lee DG, Yu HC, Yeum JH, Koh GY, Tarnawski AS : Overexpression of VEGF and angiopoietin 2 : a key to high vascularity of hepatocellular carcinoma? *Mod Pathol* (2003) 16, 552-557.
- 15) Imura S, Miyake H, Izumi K, Tashiro S, Uehara H : Correlation of vascular endothelial cell proliferation with microvessel density and expression of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in hepatocellular carcinoma. *J Med Invest* (2004) 51, 202-209.
- 16) Tanaka S, Mori M, Sakamoto Y, Makuuchi M, Sugimachi K, Wands JR : Biologic significance of angiopoietin-2 expression in human hepatocellular carcinoma. *J Clin Invest* (1999) 103, 341-345.
- 17) Shen Z, Yang ZF, Gao Y, Li JC, Chen HX, Liu CC, Poon RT, Fan ST, Luk JM, Sze KH, Li TP, Gan RB : The kringle 1 domain of hepatocyte growth factor has antiangiogenic and antitumor cell effects on hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* (2008) 68, 404-414.
- 18) Suehiro T, Matsumata T, Itasaka H, Taketomi A, Yamamoto K, Sugimachi K : Des-gamma-carboxy prothrombin and proliferative activity of hepatocellular

- carcinoma. *Surgery* (1995) 117, 682-691.
- 19) Shimada M, Takenaka K, Fujiwara Y, Gion T, Kajiyama K, Maeda T, Shirabe K, Sugimachi K : Des-gamma-carboxy prothrombin and alpha-fetoprotein positive status as a new prognostic indicator after hepatic resection for hepatocellular carcinoma. *Cancer* (1996) 78, 2094-2100.
- 20) Sakon M, Monden M, Gotoh M, Kanai T, Umeshita K, Nakano Y, Mori T, Sakurai M, Wakasa K : Relationship between pathologic prognostic factors and abnormal levels of des-gamma-carboxy prothrombin and alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma. *Am J Surg* (1992) 163, 251-256.
- 21) Inoue S, Nakao A, Harada A, Nonami T, Takagi H : Clinical significance of abnormal prothrombin (DCP) in relation to postoperative survival and prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* (1994) 89, 2222-2226.
- 22) Gotoh M, Nakatani T, Masuda T, Mizuguchi Y, Sakamoto M, Tsuchiya R, Kato H, Furuta K : Prediction of invasive activities in hepatocellular carcinomas with special reference to alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxyprothrombin. *Jpn J Clin Oncol* (2003) 33, 522-526.
- 23) Suzuki M, Shiraha H, Fujikawa T, Takaoka N, Ueda N, Nakanishi Y, Koike K, Takaki A, Shiratori Y : Des-gamma-carboxy prothrombin is a potential autologous growth factor for hepatocellular carcinoma. *J Biol Chem* (2005) 280, 6409-6415.
- 24) Ueda N, Shiraha H, Fujikawa T, Takaoka N, Nakanishi Y, Suzuki M, Matsuo N, Tanaka S, Nishina S, Uemura M : Exon 2 deletion splice variant of γ -glutamyl carboxylase causes des- γ -carboxy prothrombin production in hepatocellular carcinoma cell lines. *Molecular Oncology* (2008) 2, 241.
- 25) Tamano M, Sugaya H, Oguma M, Iijima M, Yoneda M, Murohisa T, Kojima K, Kuniyoshi T, Majima Y, Hashimoto T, Terano A : Serum and tissue PIVKA-II expression reflect the biological malignant potential of small hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* (2002) 22, 261-269.
- 26) Huisse MG, Leclercq M, Belghiti J, Flejou JF, Suttie JW, Bezeaud A, Stafford DW, Guillin MC : Mechanism of the abnormal vitamin K-dependent gamma-carboxylation process in human hepatocellular carcinomas. *Cancer* (1994) 74, 1533-1541.
- 27) Tie J, Wu SM, Jin D, Nicchitta CV, Stafford DW : A topological study of the human gamma-glutamyl carboxylase. *Blood* (2000) 96, 973-978.
- 28) Li ZQ, He FY, Stehle CJ, Wang Z, Kar S, Finn FM, Carr BI : Vitamin K uptake in hepatocytes and hepatoma cells. *Life Sci* (2002) 70, 2085-2100.
- 29) Otsuka M, Kato N, Shao RX, Hoshida Y, Ijichi H, Koike Y, Taniguchi H, Moriyama M, Shiratori Y, Kawabe T, Omata M : Vitamin K2 inhibits the growth and invasiveness of hepatocellular carcinoma cells via protein kinase A activation. *Hepatology* (2004) 40, 243-251.
- 30) Price PA, Williamson MK : Substrate recognition by the vitamin K-dependent gamma-glutamyl carboxylase : identification of a sequence homology between the carboxylase and the carboxylase recognition site in the substrate. *Protein Sci* (1993) 2, 1987-1988.
- 31) Pudota BN, Hommema EL, Hallgren KW, McNally BA, Lee S, Berkner KL : Identification of sequences within the gamma-carboxylase that represent a novel contact site with vitamin K-dependent proteins and that are required for activity. *J Biol Chem* (2001) 276, 46878-46886.
- 32) Dougher-Vermazen M, Hulmes JD, Bohlen P, Terman BI : Biological activity and phosphorylation sites of the bacterially expressed cytosolic domain of the KDR VEGF-receptor. *Biochem Biophys Res Commun* (1994) 205, 728-738.
- 33) Wu LW, Mayo LD, Dunbar JD, Kessler KM, Ozes ON, Warren RS, Donner DB : VRAP is an adaptor protein that binds KDR, a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *J Biol Chem* (2000) 275, 6059-6062.
- 34) Takahashi T, Yamaguchi S, Chida K, Shibuya M : A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *Embo J* (2001) 20, 2768-2778.
- 35) Fujikawa T, Shiraha H, Ueda N, Takaoka N, Nakanishi Y, Matsuo N, Tanaka S, Nishina S, Suzuki M, Takaki A, Sakaguchi K, Shiratori Y : Des-gamma-carboxyl prothrombin-promoted vascular endothelial cell proliferation and migration. *J Biol Chem* (2007) 282, 8741-8748.
- 36) Ding S, Merkulova-Rainon T, Han ZC, Tobelem G : HGF receptor up-regulation contributes to the angiogenic phenotype of human endothelial cells and promotes angiogenesis in vitro. *Blood* (2003) 101, 4816-4822.
- 37) Bardelli A, Longati P, Albergo D, Goruppi S, Schneider C, Ponzetto C, Comoglio PM : HGF receptor associates with the anti-apoptotic protein BAG-1 and prevents cell death. *Embo J* (1996) 15, 6205-6212.
- 38) Ueda K, Terada T, Nakanuma Y, Matsui O : Vascular supply in adenomatous hyperplasia of the liver and hepatocellular carcinoma: a morphometric study. *Hum Pathol* (1992) 23, 619-626.
- 39) Mise M, Arai S, Higashitani H, Furutani M, Niwano M, Harada T, Ishigami S, Toda Y, Nakayama H, Fukumoto M, Fujita J, Imamura M : Clinical significance of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor gene expression in liver tumor. *Hepatology* (1996) 23, 455-464.
- 40) Torimura T, Sata M, Ueno T, Kin M, Tsuji R, Suzaku K, Hashimoto O, Sugawara H, Tanikawa K : Increased expression of vascular endothelial growth factor is

- associated with tumor progression in hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol* (1998) 29, 986-991.
- 41) Kim HK, Song KS, Park YS, Kang YH, Lee YJ, Lee KR, Ryu KW, Bae JM, Kim S : Elevated levels of circulating platelet microparticles, VEGF, IL-6 and RANTES in patients with gastric cancer : possible role of a metastasis predictor. *Eur J Cancer* (2003) 39, 184-191.
- 42) Kerbel RS : Tumor angiogenesis : past, present and the near future. *Carcinogenesis* (2000) 21, 505-515.
- 43) 渋谷正史 : 血管新生阻害と腫瘍抑制. *日本理誌*(2002) 120, 285-294.
- 44) Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, Mäkinen T, Vitali A, Wilks AF, Alitalo K, Stacker SA : Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4) . *Proc Natl Acad Sci U S A* (1998) 95, 548-553.
- 45) LeCouter J, Moritz DR, Li B, Phillips GL, Liang XH, Gerber HP, Hillan KJ, Ferrara N : Angiogenesis-independent endothelial protection of liver : role of VEGFR-1. *Science* (2003) 299, 890-893.