

◆トピックス◆

Gas 6 の欠損マウス

下田 純一*, 濱本 高義*

Gas 6 Deficient Mice

Junichi SHIMODA* and Takayoshi HAMAMOTO*

Key words : Gas6 (growth arrest-specific gene 6 product), Gas6 deficiency, platelet, thrombosis

はじめに

Gas 6 (Growth arrest-specific gene 6 product) は, 1977 年, Schneider ら¹⁾ によって NIH 3 T 3 細胞の増殖停止時に特異的に発現される遺伝子 (growth arrest-specific genes) の一つとして発見された。次いで 1993 年には, Manfioletti ら²⁾ によりマウスおよびヒト由来の Gas 6 の cDNA 構造が報告された。Gas 6 の分子構造上の特徴は, 活性化プロテイン C の補因子であり, かつ血液凝固系の負の制御因子として知られるプロテイン S と, アミノ酸配列上で約 40% の相同性があり, アミノ末端領域に γ -カルボキシグルタミン酸 (Gla) ドメインを含むことである。それ故, Gas 6 の生理機能については大変興味深いが, 今日, 未だその詳細は明らかでない。

ヒト Gas 6 の構造と機能の関連や遺伝子構造, 生化学的性質などに関するこれまでの知見を要約すると, ① Gas 6 は, 678 個のアミノ酸残基からなるビタミン K 依存性タンパク質であり, その一次構造はプロテイン S と非常に類似し, アミノ酸配列において, ヒトで 44%, マウスで 43% の相同性をもつ。また, そのドメイン

構成もプロテイン S と酷似する。すなわち, アミノ末端側から, 特徴的な Gla ドメインおよび 4 つの上皮細胞成長因子 (EGF-1 -2 -3 -4) 様ドメイン, 性ホルモン結合グロブリン (SHBG) 様ドメインからなる²⁾。なお, Gla ドメインには 11~12 個の Gla 残基の存在が推定されている³⁾。しかし, Gas 6 分子内には, プロテイン S で見られるトロンビン感受性ドメインはなく, プロテイン S においてトロンビンの切断を受ける 2 つの Leu-Arg-Ser 配列が, それぞれ Ile-Gln-Lys と Phe-Ala-Thr になっており, トロンビンによる切断を受けないといわれる²⁾。② ヒト Gas 6 遺伝子は, 第 13 染色体の q 34 に位置する⁴⁾。この第 13 染色体 q 34 には, 同じビタミン K 依存性タンパク質の X 因子, VII 因子, および Protein Z の遺伝子も存在する。Gas 6 には, スプライシングの違いにより EGF 様ドメインと SHBG 様ドメインの間に, 43 アミノ酸残基 (129 bp) の挿入された変異体が存在する^{5,6)}。Manfioletti ら²⁾ は, Gas 6 の mRNA が, ヒトでは肺や腸, 骨髄, 内皮細胞に発現し, マウスでは心や肺, 胃, 筋肉等で発現していると報告しており, さらに, 造血組織や中枢神経系にも広く分布する⁷⁻¹⁰⁾。③ Gas 6 の生理的機能

* (財) 化学及血清療法研究所 血液製剤研究部 [〒 860-8568 熊本市大窪 1-6-1]

Blood Products Research Department, The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute, KAKETSUKEN [1-6-1, Okubo, Kumamoto 860-8568, Japan.]

Tel : 096-344-2189 Fax : 096-344-9234

は長い間不明であったが, 1995年, Varnumら¹¹⁾により Gas 6 が受容体型チロシンキナーゼである Axl のリガンドであることが明らかにされ, その後, Axl (Ark, Ufo, Tyro 7) と同じ受容体型チロシンキナーゼサブファミリーである, Sky (Rse, Tyro 3, Dtk, Etk, Brt, Tif) および Mer (c-Mer, Eyk, Nyk) についても, Gas 6 がリガンドであることが明らかにされた^{12)~16)}. Gas 6 のこれらレセプターへの結合は, SHBG 様ドメインを介したものであり¹⁷⁾¹⁸⁾, Gla 化されていない Gas 6 の生理活性が著しく低下することから, Gla ドメインは生理活性の調節を行っていると考えられている¹⁷⁾¹⁸⁾. ④ その他, *in vitro* の結果から, Gas 6 の生理活性として, 繊維芽細胞の生存維持と増殖促進のほか¹⁹⁾, 血管平滑筋細胞の増殖促進およびアポトーシス抑制による生存維持, 走化性誘導³⁾²⁰⁾²¹⁾, シュワン細胞の増殖促進²²⁾, 破骨細胞の機能調節²³⁾²⁴⁾, メサンギウム細胞の増殖促進²⁵⁾²⁶⁾ などが知られ, また, 内皮細胞では Gas 6 発現が多核白血球 (PMN) の接着を阻害することも示唆されている²⁷⁾. さらに, Gas 6 が Gla ドメインを介してホスファチジルセリンに特異的に結合し, SHBG 様ドメインがマクロファージ上の Axl と結合しつつ細胞貪食を促進することで, アポトーシス後の細胞のクリアランスに重要な役割を果たしている可能性もあるという²⁸⁾²⁹⁾.

最近, Gas 6 のレセプターである Axl および Sky, Mer の 3 重欠損マウスが作出され, この雄マウスが生殖細胞の分化に異常をきたすことから, Gas 6 の生殖機能への関与が示唆されている³⁰⁾. 一方, Gas 6 はプロテイン S とその分子構造が非常に類似するので, 凝固系にも何らかの関わりがあると期待されるが, Axl および Sky, Mer の 3 重欠損マウスでは, 自発的な出血や血栓形成は見られない. しかし, ヒト巨核球で Gas 6 が発現しているとの報告や⁷⁾, ラットにおいて Gas 6 が刺激血小板から放出されるという報告もある³¹⁾.

本稿では, Gas 6 欠損マウスについて紹介する.

Gas6 欠損マウスからの情報

2001年, Anglillo-Scherrer らは, 血栓・止血における Gas 6 の役割を明らかにするため, Gas 6 欠損マウスを作出した³²⁾. Gas 6 ホモ欠損マウス (Gas 6^{-/-}) は, ヘテロ欠損マウス (Gas 6^{+/-}) 同士の交配により作出された. 出生した正常マウス (Gas 6^{+/+}) および Gas 6^{+/-}, Gas 6^{-/-} それぞれの出生数は, 72 匹および 168 匹, 77 匹であり, 出生率はほぼメンデル則に従った. Gas 6^{-/-} は正常マウスと比較して, 大きさや体重に差はなく, 同腹仔数も同等で, 行動や発育状態, 繁殖力にも異常を認めなかった. また, Gas 6^{-/-} は, 出血傾向や血栓形成傾向も認められず, 尾の切断による出血後の止血にも何ら異常はなかった. さらに, 各凝固因子 (フィブリノゲン, II, V, VIII, IX, X) の血漿中濃度, PT や APTT, 赤血球数, 白血球数, 血小板数, などの数値に各遺伝子型で差を認めなかった.

そこで, Anglillo-Scherrer らは以下の 3 つの血栓症モデルを用いて, Gas 6 欠損の影響を調べた.

1. 腹部大静脈の結紮による血小板活性化と, 凝固活性化に起因する血流停止誘導の静脈血栓症モデル.
2. 頸動脈の光化学的血管表面剝離による多血小板および多フィブリン血栓症モデル.
3. コラーゲン/エピネフリンの静脈内投与による血小板依存性の血栓塞栓症モデル.

Fig. 1-a に示すように, モデル 1 の実験では, Gas 6^{-/-} の血栓の大きさは, 正常マウスの血栓と比較すると 85% も少なかった. モデル 2 の実験でも, Gas 6^{-/-} の血栓の大きさは, 正常マウスの血栓と比較して 60% も小さくなっていった (**Fig. 1-b**). また, モデル 3 の実験では, コラーゲン/エピネフリンの静脈投与で, 正常マウスが投与後 1~3 分でその 80% が死亡したのに対

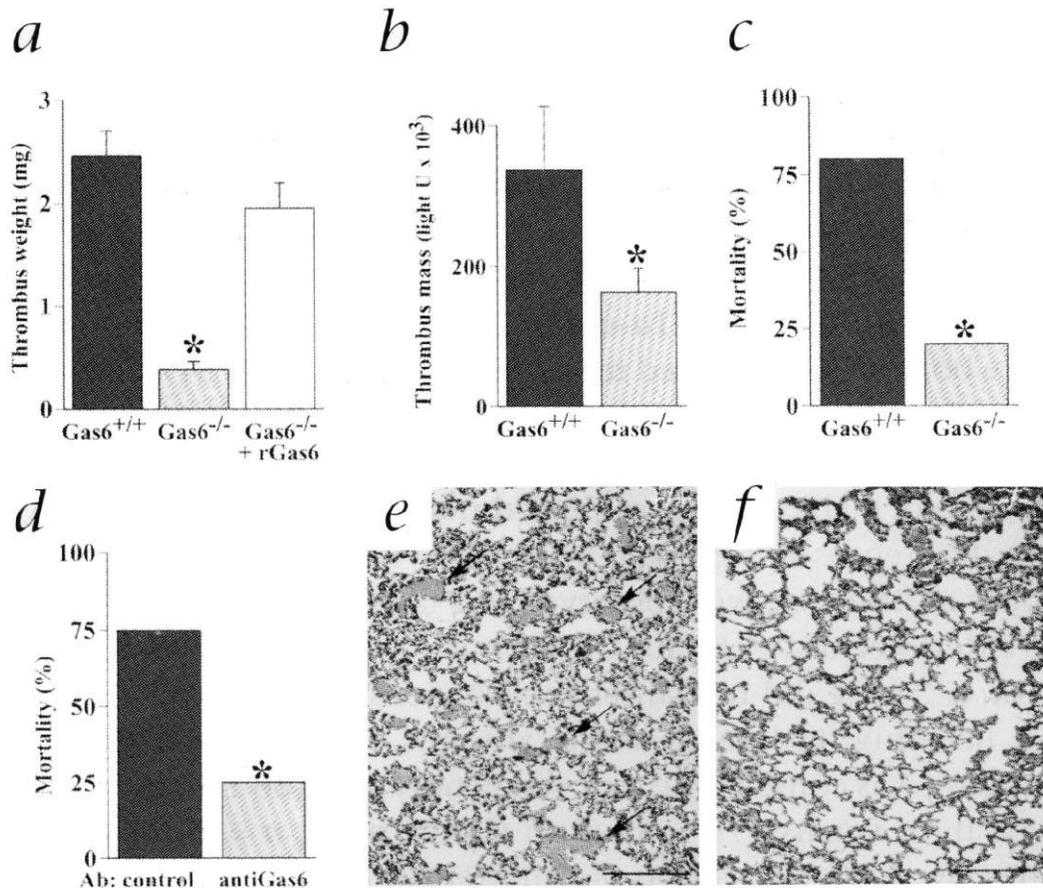


Fig. 1 Gas 6 欠損マウス (Gas6^{-/-}) の血栓形成に対する耐性 (文献 32 より引用)
 a: 腹部大静脈の結紮による血栓症モデルにおける血栓量 (n=10; mean±s.e.m; *, p<0.001)
 b: 血管表面剝離による血栓症モデルにおける血栓量 (n=5; *, p<0.001)
 c: コラーゲン/エピネフリンの静脈内投与による血栓塞栓症モデルにおける死亡率 (n=10)
 d: 抗 Gas 6 抗体投与マウスのコラーゲン/エピネフリンの静脈内投与による血栓塞栓症モデルにおける死亡率 (■, n=16; □, n=12 *, p<0.03)
 e, f: 血栓塞栓症モデルの正常マウス (e) と生存した Gas6^{-/-} (f) での肺における血栓塞栓 (矢印)
 (転載許可取得)

し, Gas6^{-/-} では, 投与後 10~15 分経過しても 20%しか死亡しなかった (Fig. 1-c). これらの結果から, Gas6^{-/-} の血栓形成が正常マウスと比較して, 遅く, 小さいことが考えられた. 実際, Fig. 1-e, f に示すように, 組織学的にも, 正常マウスでは肺の広範囲に見られる血栓も, 生存した Gas6^{-/-} では観察されなかった. さらに, Gas6^{-/-} と正常マウスとで, 多血小板あるいは乏血小板フィブリン塊の溶解について比較したが, どちらの場合にも, 溶解時間および溶解

量に差はなかった. したがって, Gas6^{-/-} の血栓形成に対する耐性は, 血栓溶解が促進したことによるものではないと推定した.

上述の血栓症モデルでは, 血栓形成に血小板凝集反応が絡んでいることから, 次に Anglillo-Scherrer らは, Gas6^{-/-} の血小板機能を調べた.

Gas6^{-/-} の血小板数や巨核球数は正常マウスと同等で, それらの細胞形態にも特に異常はなく, 血小板の超微細構造も正常マウスとの間に

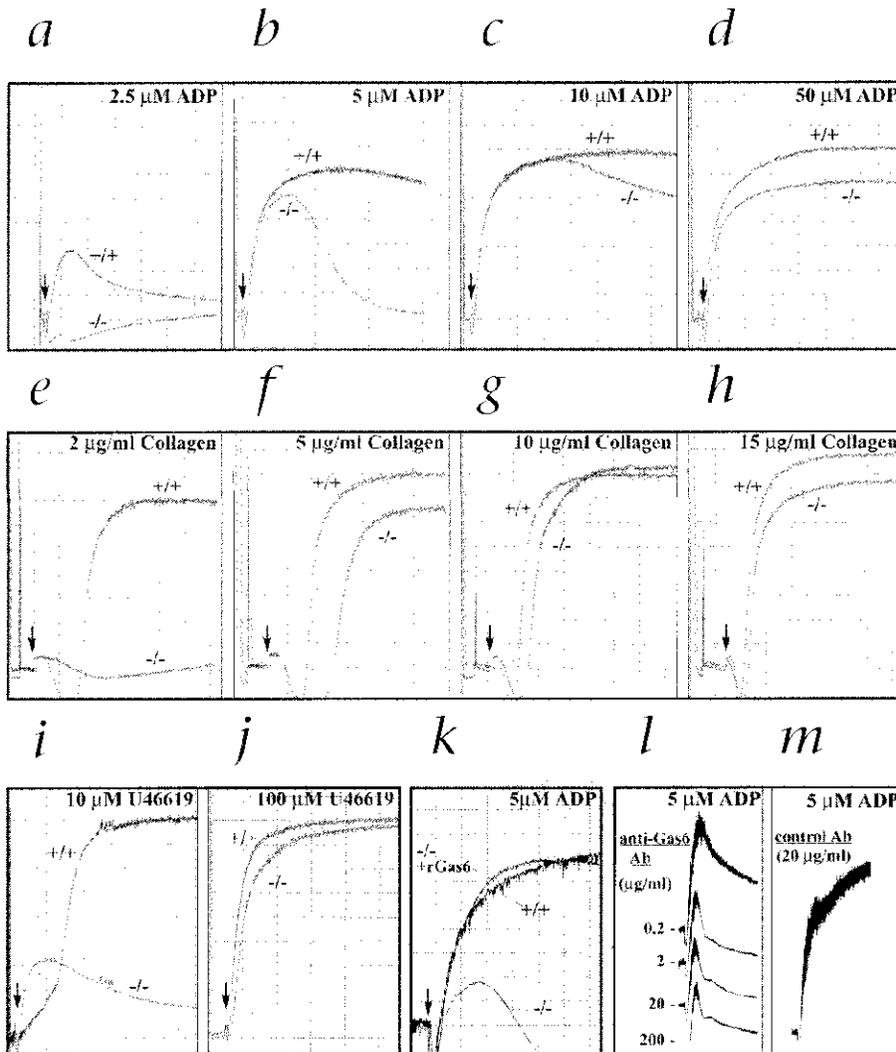


Fig. 2 正常マウス (Gas6^{+/+}) および Gas6 欠損マウス (Gas6^{-/-}) の血小板凝集反応における各種アゴニストの濃度依存性 (文献 32 より引用)

a~d: ADP 2.5 μM (a), 5 μM (b), 10 μM (c), 20 μM (d).

e~h: コラーゲン 2 μg/ml (e), 5 μg/ml (f), 10 μg/ml (g), 2 μg/ml (h).

i, j: U 46619 10 μM (i), 100 μM (j).

k: Gas6^{-/-} に組換えマウス Gas6 投与後, 血小板を ADP 5 μM で刺激.

l, m: 正常マウスの血小板凝集に与える抗 Gas6 抗体の効果. 抗 Gas6 抗体処理 (l), と抗 Gas6 抗体未処理 (m). 血小板を ADP 5 μM で刺激.

矢印はアゴニスト投与の時期を示した. (転載許可取得)

差はなかった. しかし, Gas6^{-/-} の血小板を, 正常マウスでは十分非可逆的な血小板凝集を起こす低濃度の ADP (<10 μM) やコラーゲン (2 μg/ml), TXA₂ 類縁体である U 46619 (10 μM) などのアゴニストで刺激しても, 非可逆凝集は

起こさず, わずかな形態変化を示すのみであった. ただし, 高濃度のアゴニスト (ADP: 50 μM, コラーゲン: 5~15 μg/ml, U 46619: 100 μM) で Gas6^{-/-} の血小板を刺激すると, 正常マウスと同様に非可逆凝集を起こした (Fig. 2-a~j).

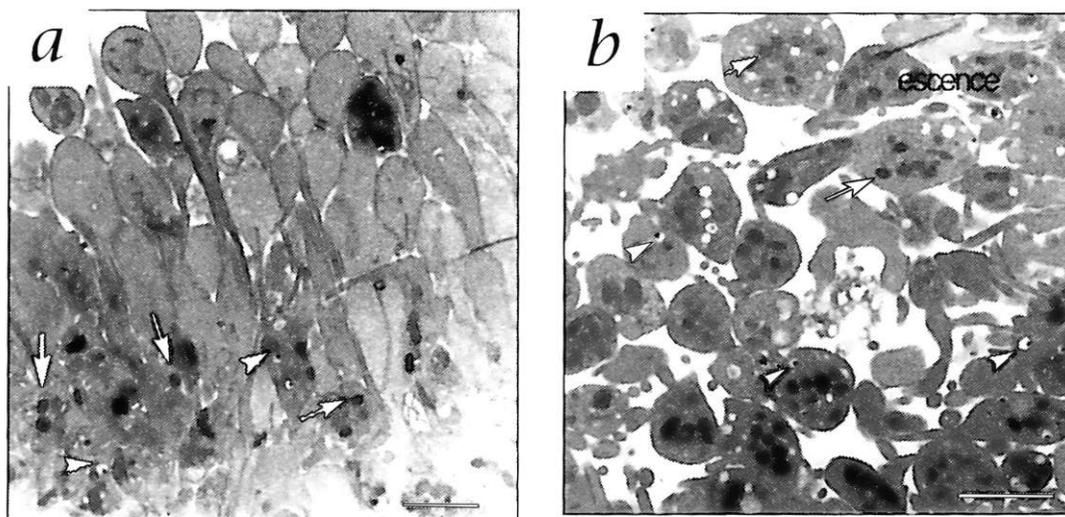


Fig. 3 トロンビン刺激による正常マウスと Gas6 欠損マウス (Gas6^{-/-}) の血小板凝集像 (文献 32 より引用)
 正常マウス (a), Gas6^{-/-} (b).
 矢印は α 顆粒, 矢印頭は濃染顆粒. (転載許可取得)

一方, フォルボルエステル (phorbol-12-myristyl-13-acetate: PMA) あるいはカルシウムイオノフォア (A 23187) で血小板を刺激した場合には, ADP やコラーゲンなどで観察された濃度依存的な血小板凝集の差は認められず, 正常マウスおよび Gas6^{-/-} ともに同程度の血小板凝集反応を示した. また, トロンビンによる刺激でも, Gas6^{-/-} は正常マウスに匹敵する血小板凝集能を示した. その際, 正常マウスの血小板凝集では, 血小板が相互に接着した密な状態で, かつ完全に脱顆粒しているのに対して, Gas6^{-/-} の凝集は, 血小板は疎な状態で, かつ相互の接触も少なく, 脱顆粒も不完全であった (**Fig. 3-a, b**). Gas6^{-/-} と正常マウスの洗浄血小板を用いたフローサイトメトリーでは, 正常マウス血小板表面で, ADP 刺激による α 顆粒の放出に伴うフィブリノゲンの増加が観測されたが, Gas6^{-/-} ではフィブリノゲンの増加は見られなかった. これは Gas6^{-/-} の血小板凝集が密でなかったことに関係するのであろう. なお, 両遺伝子型マウスで, 血小板中に含まれるフィブリノゲン量は同程度であった.

このように Gas6^{-/-} が脱顆粒不全を伴う血

小板凝集異常を示したことから, 正常マウス血小板では, 血小板から放出された Gas6 が血小板表面上のレセプターに結合して凝集反応を制御していることが推察される. そこで, 血小板での Gas6 の発現と Gas6 のレセプターである Axl や Sky, Mer の発現を, 静止血小板と刺激血小板について調べた. その結果, 正常マウスにおいて, 静止血小板抽出物中とトロンビンで活性化した血小板放出物中に Gas6 が確認され, さらに, ヒト血小板中でも Gas6 の mRNA と Gas6 が確認された. 超微細構造分析と免疫学的手法による解析から, Gas6 は血小板中でフィブリノゲンとともに α 顆粒に局在しており, ADP による血小板刺激で表面に放出されることが明らかとなった. また, Gas6^{-/-} の血小板表面上には, Gas6 レセプターである Axl および Sky が正常マウスと同程度発現しており, Gas6^{-/-} の血小板凝集異常が Gas6 レセプターの発現異常に起因しないことが示唆された. なお, Gas6 のレセプターである Axl および Sky, Mer は, ヒトの血小板中にもそれらの mRNA が確認され, 免疫学的手法による解析から, 静止血小板表面には, 主に Axl が局在し

ていることが明らかとなった。

トロンビン刺激した血小板凝集の超微細構造解析は, Gas 6^{-/-}の血小板での脱顆粒低下を示した。血小板凝集の過程において, 小さく不安定な初期段階での血小板凝集後の濃染顆粒放出は, その後の安定な血小板凝集を形成するのに非常に重要である。そこで, Gas 6^{-/-}血小板の濃染顆粒放出について調べた。その結果, Gas 6^{-/-}を低濃度のアゴニスト (ADP, コラーゲン, U 46619) で刺激した時, 濃染顆粒放出のマーカーである ATP 放出が正常マウスと比較して大幅に低下し, 初期段階での濃染顆粒放出がかなり減少していた。しかし, 血小板が非可逆的な凝集を生じるような高濃度のアゴニストでの刺激では, Gas 6^{-/-}血小板からは正常マウスの血小板と同程度の ATP 放出が認められた。こうした脱顆粒の低下現象は, α 顆粒の放出においても同様で, Gas 6^{-/-}の刺激血小板では, α 顆粒放出のマーカーである P-セレクトインの発現が低下していた。ただし, 静止血小板やトロンビン刺激した血小板において検出される TXA₂ 量は, 両遺伝子型で同程度であった。このようにアゴニストによる血小板刺激において, Gas 6^{-/-}の血小板では脱顆粒不全と血小板凝集異常に相関が見られた。

最後に Anglillo-Scherrer らは, Gas 6^{-/-}で観察された血小板凝集異常が Gas 6 欠損によるものであることを確認するために, Gas 6^{-/-}の血小板に 293 細胞由来の組換えマウス Gas 6 を添加して, その血小板凝集異常回復効果を調べた。その結果, 組換え Gas 6 存在下で Gas 6^{-/-}の血小板を刺激すると, 血小板凝集が回復し, 正常な ATP 放出が見られた。一方, *in vivo* の実験で, Gas 6^{-/-}に組換え Gas 6 を投与すると, 血栓形成が正常化した (Fig. 1-a, Fig. 2-k)。

さらに, Gas 6 に対する特異抗体を用いて, Gas 6 依存的に血栓形成抑制が起こることを, *in vitro* における血小板凝集試験および *in vivo* における正常マウスでの血栓症モデルで調べた。その結果, *in vitro* の実験では, 正常マ

ウスの血小板において, ADP 刺激による凝集が抗体濃度依存的に阻害され, *in vivo* の実験では, 抗体投与によりコラーゲン/エピネフリン誘導の致死的な血栓塞栓症に対して Gas 6^{-/-}と同程度の耐性が認められた (Fig. 1-d, Fig. 2-l, m)。

おわりに

以上を要約すると, ① Gas 6^{-/-} は, 胚および胎仔時期に死亡せず, 正常マウスと同様に健康に誕生し発育した。また, 生殖機能や繁殖力も正常であった。② 自発的な出血傾向や血栓傾向はなく, 凝血学的にも異常を認めなかった。③ しかし, Gas 6^{-/-} は, 各種血栓症モデルにおいて血栓形成に対する耐性を示した。*in vitro* の検討で, Gas 6^{-/-}の血小板では, 低濃度のアゴニストによる刺激で, 形態変化は生じるものの, 非可逆な凝集は起こさなかった。その原因は血小板凝集過程における脱顆粒不全に起因していた。また, Gas 6 が血小板の顆粒内に存在すること, そのレセプターの Axl や Sky も発現していることが確認された。さらに, Gas 6^{-/-}の血小板における脱顆粒不全は, Gsa 6 とそのレセプターである Axl や Sky 依存性のシグナル伝達の増幅欠如であることが示唆された。このことは, 組換え Gas 6 の添加実験や, Gas 6 に対する特異的抗体を用いた検討からも支持された。

このように, 今回の Gas 6 欠損マウスを用いた研究からは, 従来, Gas 6 について知られていた生理機能の裏付けは得られなかったものの, Gas 6 は血小板凝集反応に深く関与しており, 各種アゴニストによる血小板の脱顆粒反応を促進する新たな機能が明らかになった。

謝 辞: 御校閲を戴きました岩永貞昭先生 (九州大学名誉教授) に深謝いたします。

文 献

- 1) Schneider C, King RM, Philipson L: Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells. *Cell* **54**: 787-793, 1988.
- 2) Manfioletti G, Brancolini C, Avanzi G, Schneider C: The protein encoded by a growth arrest-specific gene (gas6) is new member of the vitamin K-dependent proteins related to protein S, a negative coregulator in the blood coagulation cascade. *Mol Cell Biol* **13**: 4976-4985, 1993.
- 3) Nakano T, Higashino K, Kikuchi N, Kishino J, Nomura K, Fujita H, Ohara O, Arita H: Vascular smooth muscle cell-derived, Gla-containing growth-potentiating factor for Ca²⁺-mobilizing growth factors. *J Biol Chem* **270**: 5702-5705, 1995.
- 4) Saccone S, Marcandalli P, Gostissa M, Schneider C, Della Valle G: Assignment of the human GAS6 gene to chromosome 13q34 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* **30**: 129-131, 1995.
- 5) Marcandalli P, Gostissa M, Varnum B, Goruppi S, Schneider C: Identification and tissue expression of a splice variant for the growth arrest-specific gene gas6. *FEBS Lett* **415**: 56-58, 1997.
- 6) Goruppi S, Yamane H, Marcandalli P, Garcia A, Clogston C, Gostissa M, Varnum B, Schneider C: The product of a gas6 splice variant allows the release of the domain responsible for Axl tyrosine kinase receptor activation. *FEBS Lett* **415**: 59-63, 1997.
- 7) Avanzi GC, Gallicchio M, Cavalloni G, Gammaitoni L, Leone F, Rosina A, Boldorini R, Monga G, Pegoraro L, Varnum B, Aglietta M: GAS6, the ligand of Axl and Rse receptors, is expressed in hematopoietic tissue but lacks mitogenic activity. *Exp Hematol* **25**: 1219-1226, 1997.
- 8) Dormady SP, Zhang XM, Basch RS: Hematopoietic progenitor cells grow on 3T3 fibroblast monolayers that overexpress growth arrest-specific gene-6 (GAS6). *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 12260-12265, 2000.
- 9) Prieto AL, Weber JL, Trancy S, Heeb MJ, Lai C: Gas6, a ligand for the receptor protein-tyrosine kinase Tyro-3, is widely expressed in the central nervous system. *Brain Res* **816**: 646-661, 1999.
- 10) Prieto AL, Weber JL, Lai C: Expression of the receptor protein-tyrosine kinases Tyro-3, Axl, and Mer in the developing rat central nervous system. *J Comp Neurol* **425**: 295-314, 2000.
- 11) Varnum BC, Young C, Elliott G, Garcia A, Bartley TD, Fridell YW, Hunt RW, Trail G, Clogston C, Toso RJ, Yanagihara D, Bennett L, Sylber M, Merewether LA, Tseng A, Escobar E, Liu ET, Yamane HK: Axl receptor tyrosine kinase stimulated by the vitamin K-dependent protein encoded by growth-arrest-specific gene 6. *Nature* **373**: 623-626, 1995.
- 12) Godowski PJ, Mark MR, Chen J, Sadick MD, Raab H, Hammonds RG: Reevaluation of the roles of protein S and Gas6 as ligands for the receptor tyrosine kinase Rse/Tyro 3. *Cell* **82**: 355-358, 1995.
- 13) Ohashi K, Nagata K, Toshima J, Nakano T, Arita H, Tsuda H, Suzuki K, Mizuno K: Stimulation of sky receptor tyrosine kinase by the product of growth arrest-specific gene 6. *J Biol Chem* **270**: 22681-22684, 1995.
- 14) Nagata K, Ohashi K, Nakano T, Arita H, Zong C, Hanafusa H, Mizuno K: Identification of the product of growth arrest-specific gene 6 as a common ligand for Axl, Sky, and Mer receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem* **271**: 30022-30027, 1997.
- 15) Chen J, Carey K, Godowski PJ: Identification of Gas6 as a ligand for Mer, a neural cell adhesion molecule related receptor tyrosine kinase implicated in cellular transformation. *Oncogene* **14**: 2033-2039, 1997.
- 16) Mark MR, Chen J, Hammonds RG, Sadick M, Godowski PJ: Characterization of Gas6, a member of the superfamily of G domain-containing proteins, as a ligand for Rse and Axl. *J Biol Chem* **271**: 9785-9789, 1996.
- 17) Tanabe K, Nagata K, Ohashi K, Nakano T, Arita H, Mizuno K: Roles of gamma-carboxylation and a sex hormone-binding globulin-like domain in receptor-binding and in biological activities of Gas6. *FEBS Lett* **408**: 306-310, 1997.
- 18) Nakano T, Kawamoto K, Kishino J, Nomura K, Higashino K, Arita H: Requirement of gamma-carboxyglutamic acid residues for the biological activity of Gas6: contribution of endogenous Gas6 to the proliferation of vascular smooth muscle cells. *Biochem J* **323**: 387-392, 1997.
- 19) Goruppi S, Ruaro E, Schneider C: Gas6, the ligand of Axl tyrosine kinase receptor, has mitogenic and survival activities for serum starved NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene* **12**: 471-480, 1996.
- 20) Nakano T, Kawamoto K, Higashino K, Arita H: Prevention of growth arrest-induced cell death of vascular smooth muscle cells by a product of growth arrest-specific gene, gas6. *FEBS Lett* **387**: 78-80, 1996.
- 21) Fridell YW, Villa J Jr, Attar EC, Liu ET: GAS6 induces Axl-mediated chemotaxis of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **273**: 7123-7126, 1998.
- 22) Li R, Chen J, Hammonds G, Phillips H, Armanini M, Wood P, Bunge R, Godowski PJ, Sliwkowski MX, Mather JP: Identification of Gas6 as a growth factor for human Schwann cells. *J Neurosci* **16**: 2012-2019, 1996.
- 23) Nakamura YS, Hakeda Y, Takakura N, Kameda T, Hamaguchi I, Miyamoto T, Kakudo S, Nakano T, Kumegawa M, Suda T: Tyro 3 receptor tyrosine kinase and its ligand, Gas6, stimulate the function of osteoclasts. *Stem Cell* **16**: 229-238, 1998.
- 24) Katagiri M, Hakeda Y, Chikazu D, Ogasawara T, Takato T, Kumegawa M, Nakamura K, Kawaguchi H: Mechanism of stimulation of osteoclastic bone resorption through Gas6/Tyro 3, a receptor tyrosine kinase signaling, in mouse osteoclasts. *J Biol Chem* **276**: 7376-7382, 2001.
- 25) Yanagita M, Ishii K, Ozaki H, Arai H, Nakano T, Ohashi K, Mizuno K, Kita T, Doi T: Mechanism of inhibitory effect of warfarin on mesangial cell proliferation. *J Am Soc Nephrol* **10**: 2503-2509, 1999.
- 26) Yanagita M, Arai H, Ishii K, Nakano T, Ohashi K, Mizuno K, Varnum B, Fukatsu A, Kita T, Doi T: Gas6 regulates mesangial cell proliferation through Axl in experimental glomerulonephritis. *Am J Pathol* **158**: 1423-1432, 2001.
- 27) Avanzi GC, Gallicchio M, Bottarel F, Gammaitoni L,

- Cavalloni G, Buonfiglio D, Bragardo M, Bellomo G, Albano E, Fantozzi R, Garbarino G, Varnum B, Aglietta M, Saglio G, Dianzani U, Dianzani C: GAS6 inhibits granulocyte adhesion to endothelial cells. *Blood* **91**: 2334-2340, 1998.
- 28) Nakano T, Ishimoto Y, Kishino J, Umeda M, Inoue K, Nagata K, Ohashi K, Mizuno K, Arita H: Cell adhesion to phosphatidylserine mediated by a product of growth arrest-specific gene 6. *J Biol Chem* **272**: 29411-29414, 1997.
- 29) Ishimoto Y, Ohashi K, Mizuno K, Nakano T: Promotion of the uptake of PS liposomes and apoptotic cells by a product of growth arrest-specific gene, gas6. *J Biochem* **127**: 411-417, 2000.
- 30) Lu Q, Gore M, Zhang Q, Camenisch T, Boast S, Casagrande F, Lai C, Skinner MK, Klein R, Matsu-shima GK, Earp HS, Goff SP, Lemke G: Tyro-3 family receptors are essential regulators of mammalian spermatogenesis. *Nature* **398**: 723-728, 1999.
- 31) Ishimoto Y, Nakano T: Release of a product of growth arrest-specific gene 6 from rat platelets. *FEBS Lett* **466**: 197-199, 2000.
- 32) Angelillo-Scherrer A, de Frutos P, Aparicio C, Melis E, Savi P, Lupu F, Arnout J, Dewerchin M, Hoylaerts M, Herbert J, Collen D, Dahlback B, Carmeliet P: Deficiency or inhibition of Gas6 causes platelet dysfunction and protects mice against thrombosis. *Nature Med* **7**: 215-221, 2001.