HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	オステオポンチンの構造解析と機能に関する研究
Author(s)	今, 重之
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第5797号
Issue Date	2002-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k5797
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/32610
Type	doctoral thesis
File Information	5797.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位申請論文

オステオポンチンの構造解析と機能に関する研究

北海道大学
医学研究科　病理系専攻

今　重之

目次

第1章　序論

1-1. OPNの構造と受容体 ・・・ 1

1-2. OPNによるNO制御 ・・・ 3

1-3. OPNと腫瘍 ・・・ 4

1-4. OPNと免疫系 ・・・ 5

1-5. 全長型OPNと切断型OPN ・・・ 7

第2章　リコンビナントOPN精製タンパク質の作製

2-1. 序 ・・・ 9

2-2. 実験方法

2-2-1 ヒトOPN cDNAのクローニング ・・・ 10

2-2-2 GST融合タンパク質の作製 ・・・ 11

2-2-3 ヒトOPN安定発現CHO-K1細胞株の樹立 ・・・ 11

2-2-4 ヒトOPN安定発現CHO-K1細胞株からの
ヒトOPNタンパク質精製 ・・・ 12

2-2-5 OPNのトロンビン切断 ・・・ 12

2-3. 実験結果

2-3-1 ヒトOPNタンパク質の精製 ・・・ 13

2-4. 考察 ・・・ 14

第3章　ヒトOPNに対する多様な検出系、定量系の確立と

OPN 産生形態の解析

3-1. 序 ・・・15

3-2. 実験方法

3-2-1. 合成ペプチドを用いた抗ヒト OPN ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の作製 ・・・ 15

3-2-2. ウエスタンブロット解析 ・・・ 16

3-2-3. サンドイッチ ELISA システムの確立 ・・・ 16

3-2-4. 細胞培養 ・・・ 17

3-2-5. 尿サンプルの採取方法 ・・・ 17

3-2-6. クレアチニンの測定方法 ・・・ 18

3-3. 実験結果

3-3-1. 合成ペプチドに対する抗体の特異性 ・・・ 18

3-3-2. ヒト OPN に対するサンドイッチ ELISA 系の構築 ・・・ 19

3-3-3. 培養細胞上清中 OPN の検出 ・・・ 20

3-3-4. 尿中 OPN の検出 ・・・ 20

3-4. 考察 ・・・ 22

第 4 章 OPN 内機能部位の探索

4-1. 序 ・・・ 27

4-2. 実験方法

4-2-1. マウス、ラット OPN タンパク質の精製 ・・・ 27

4-2-2. 合成ペプチドを用いた抗ヒト OPN モノクローナル抗体の作製 ・・・ 28

4-2-3. ウエスタンブロット解析 ・・・ 28

4-2-4. 細胞培養 ・・・ 28
4-2-5. 細胞接着阻害試験 ・・・ 29
4-2-6. ELISA 法 ・・・ 29
4-2-7. 細胞遊走試験 ・・・ 30

4-3 実験結果
4-3-1. モノクローナル抗体による細胞接着阻害効果 ・・・ 30
4-3-2. 2K1 と mAb53 のエピトープ解析 ・・・ 31
4-3-3. 2K1 のマウス、ラット OPN に対する交差反応性 ・・・ 32
4-3-4. α9β1 インテグリンと OPN との接着に対する
2K1 の影響 ・・・ 33
4-3-5. OPN 誘導細胞遊走に対するモノクローナル抗体
の効果 ・・・ 33

4-4. 考察 ・・・ 33

第 5 章 本研究の臨床への応用

5-1. OPN 測定の臨床的意義 ・・・ 38
5-2. OPN 機能阻害抗体 2K1 の臨床への応用 ・・・ 38

第 6 章 今後の研究課題 ・・・ 40

第 7 章 結語 ・・・ 41

第 8 章 参考文献 ・・・ 42

第 9 章 略語表 ・・・ 53

謝辞 ・・・ 55

第1章　序論

1-1.　OPNの構造と受容体

オステオポンチン(OPN)は、もともとカルシウムの沈着した骨組織のマトリックスを構成する主要な非コラーゲン性タンパク質として同定された、分子量約41kDaの分泌型酸性リン酸化糖タンパク質である。乳汁、尿、腎尿細管、破骨細胞、骨芽細胞、マクロファージ、活性化T細胞、ある種の腫瘍組織など広く発現が認められる。アミノ酸の組成は、セリン、アスパラギン酸、グルタミン酸の三種に富み、これだけで約半分を構成する。分子中央部には細胞接着に重要とされているGly-Arg-Gly-Asp-Ser (GRGDS)配列とその直後にはトロンビン開裂部位が存在する。主な動物の一次構造を比較すると（図1-1)、GRGDS配列は、種を超えて良く保存されており、OPNにおいて重要な機能を持つ部位ということが推察される。アスパラギン酸が連続するアスパラギン酸連続部位はハイドロキシアパタイトとの結合に関与しているといわれている。他にもヘパリン結合部位、カルシウム結合部位が存在し、多彩な機能を有することが予想される（図1-2)。

OPNは、その名の示すように骨基質中で破骨細胞 (Os)とハイドロキシアパタイトをつなぐ架け橋 (Pons) として働くと考えられていたが [Miyauchi et al, 1991]、他にもOPNは細胞接着、細胞遊走、一酸化窒素(NO)産生の制御、腫瘍、免疫系への関与など多彩な機能が報告されてきている。

OPNは、分子の中央部にRGD配列をもつことから、クローニング当初から細胞接着能を有し、受容体はインテグリンであると予想されていた [Yamada., 1991]。事実、OPNは骨、上皮、平滑筋細胞に対して接着が認められ [Brown et al., 1992; Flores et al., 1992; Chambers et al., 1993]、OPN受容体としてαvβ3が同定された [Oldberg et al., 1988; Miyauchi et al., 1991; Ross 1993; Liaw et al., 1994]。抗αvβ3抗体を用いて接着阻害を試みた結果、部分的にしか阻害されないことから、RGDを介する別の受容体の存在が示され、現在までにRGDを介するOPN受容体として、α5β1、α8β1、αvβ1、αvβ3、αvβ5が同定されている [Hu et al., 1995; Denda et al., 1998]。生体内にトロンビン切断型 OPN が存在し、機能的な役割をしているという報告 [Senger et al., 1988; Senger et al., 1989]や、当研究室の片桐らは、OPNはGRGDSペプチド

非依存性接着があることを見いだした [Katagiri et al., 1996]。その後、Smith らはトロンビン切断部位までのアミノ基 (N) 末フラグメントを作製し、トロンビン切断型 N 末 OPN 中にα9β1 に対する接着部位が隠れていることを見いだした [Smith et al., 1996]。後に、この接着は RGD 非依存性ということが証明され、RGD 配列に近接する SVVYGLR 配列が重要であることが示

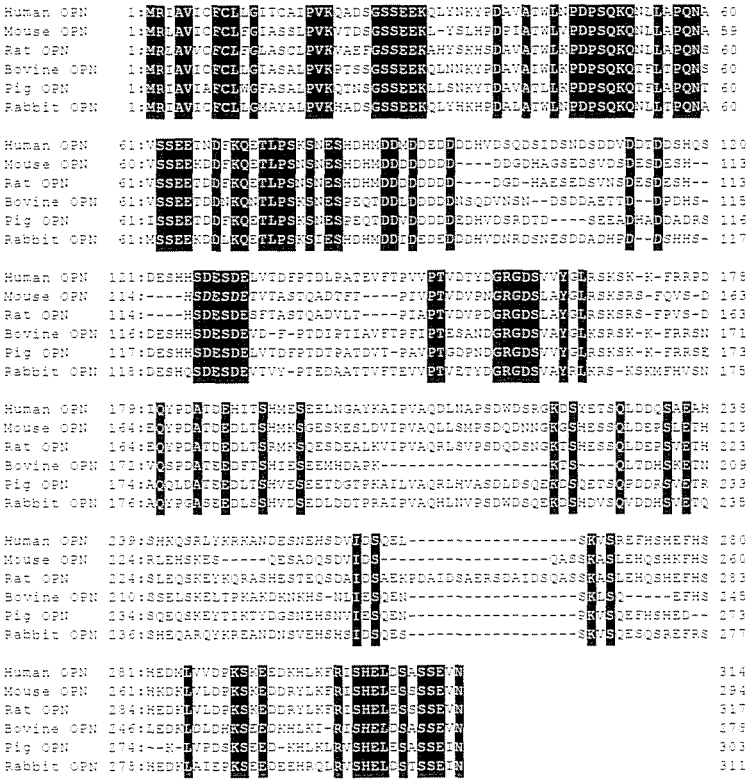


図 1-1. 主な動物の OPN 一次構造の比較

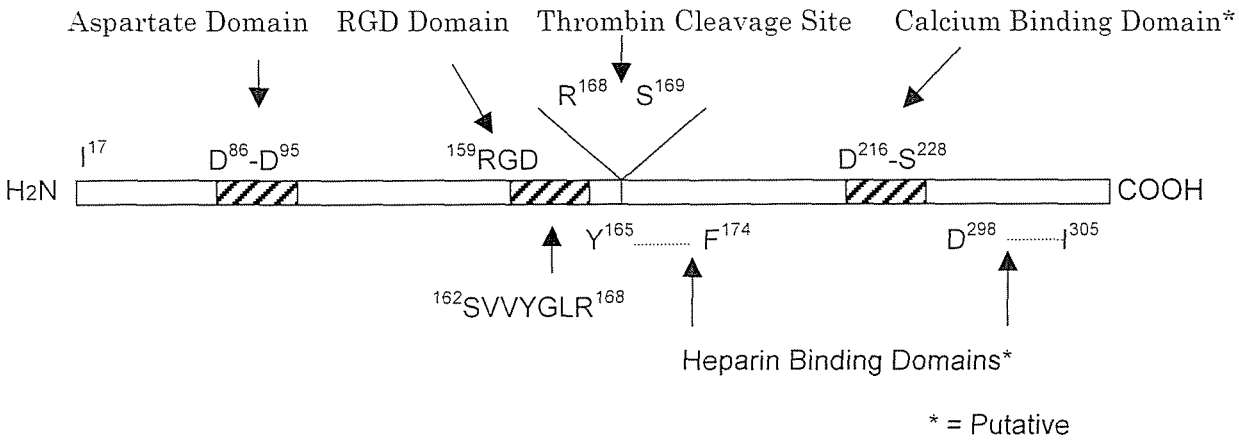


図 1-2. ヒト OPN の機能ドメイン

された [Yokosaki et al., 1999; Yokosaki et al., 2000]。OPN 上の SVVYGLR 配列は、α4β1、α4β7 に対する接着にも重要とされ、α4β1 に対する接着はさらに ELVTDFPTDLPAT 配列も必要であり、α4β1、α4β7 に対する SVVYGLR 配列上の重要なアミノ酸残基は異なっている[Bayless et al., 2001; Green et al., 2001]。また、α4β1 と結合する OPN はトロンビン切断を必要としない[Barry et al., 2000]。これらの事柄は、α9β1、α4β1、α4β7 は OPN 上の SVVYGLR 配列を介して結合しているが、その結合様式は多様ということを示している。α4β1、α4β7 に対する接着に重要となる SVVYGLR 配列内アミノ酸を図 1-3 に示す。OPN のインテグリン以外の受容体として CD44 が報告されている [Weber et al., 1996; Weber et al., 1997]。OPN をリガンドとしたアフィニティークラマトグラフィーにおいて CD44 との結合が認められ、OPN に接着性を示さない細胞に CD44 を遺伝子導入したところ、接着性を示すようになる。OPN と CD44 との結合により細胞遊走、接着が惹起され、従来より知られていた CD44 のリガンドであるヒアルロン酸 (HA) との結合により細胞凝集が引き起こされる。OPN とインテグリンとの接着は、Mn^{2+} や Mg^{2+}などの二価イオンが必要であるが、CD44 との結合には必要としないという特徴も見いだされている。しかしながら、CD44 は OPN の受容体ではないという相反する報告がある [Smith et al., 1999]。当教室の片桐らは、CD44v の発現亢進により CS44v とβ1 の物理的会合が起こり、β1 を介する OPN との結合が増加することを見いだしており、２つの相反する説を説明する所見である [Katagiri et al., 1999]。

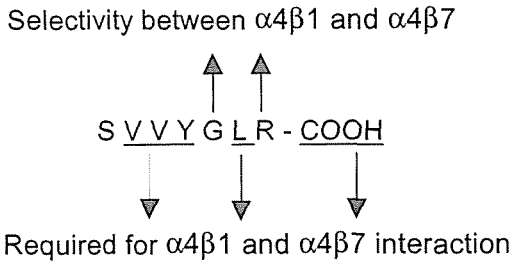


図 1-3. α4β1、α4β7 に対する SVVYGLR 配列上の重要なアミノ酸残基
VVY、L、COOH 基はα4β1、α4β7 共に接着に重要な残基であり、G はα4β1 に、R はα4β7 にそれぞれ重要な残基である。

1-2. OPN による NO 制御

OPN は NO 産生調節作用を有する。Rollo らは、添加したリコンビナント OPN がマクロファージからの NO 産生を抑制することを報告した [Rollo et al., 1996]。Singh らは、OPN が心筋細胞や血管内皮細胞において NO 合成酵素 (iNOS) 発現を減少させることや、IL-1β と IFN-γ

で刺激した血管内皮細胞にアンチセンス OPN 遺伝子を導入し内在性 OPN 発現を抑えた結果、NO 産生が抑制されることを見いだしている [Singh et al., 1995; Singh et al., 1999]。ヒト軟骨ではαvβ3 に対する阻害抗体を用いて OPN との接着を阻害した結果、NO 産生が抑えられ [Attur et al., 2000]、マウス腎近位尿細管細胞では IFN-γや LPS などの炎症性メディエーター刺激によって産生する NO を、OPN は iNOS 発現を mRNA レベルで抑制する [Hwang et al, 1994]。さらに、NO 自身が OPN 発現を上昇させ [Takahashi et al., 2000]、それは OPN のプロモーター活性を上昇させることによることが明らかとなった [Guo et al., 2001]。これらの事柄は、OPN は NO のシグナル伝達や NO が媒介する細胞調節機構に対し、負のフィードバック調節機構をもつ因子であることを示唆している。

1-3. OPN と腫瘍

OPN 発現は腫瘍の進行度と相関し、癌転移との関連性が示唆されている [Senger et al., 1988; Chambers et al., 1993; Brown et al., 1994]。肺癌、肝癌、乳癌、前立腺癌などの患者の血漿から OPN が検出されており[Senger et al., 1988]、正常部と比較して癌部の OPN mRNA は上昇している[Brown et al., 1994; Dunnington et al., 1983]。同様にグリオーマにおける OPN 発現も悪性度と相関する傾向が見いだされている [Saitoh et al., 1995]。OPN 発現と腫瘍との相関は動物モデルにおいても確かめられている [Oldberg et al., 1986]。腫瘍細胞である PAP2 細胞 (H-ras-transformed, metastatic NIH3T3 細胞)と NIH3T3 の OPN 発現は PAP2 細胞の方が高い[Chambers et al., 1993]。この PAP2 細胞にアンチセンス OPN を遺伝子導入した細胞は腫瘍形成能が低下していた [Behrend et al., 1994]。Gardner らは、ラット線維芽細胞を腫瘍化した B77 Rat 1 細胞をヌードマウスに投与することによって起こる肺転移結節数を調べているが、OPN のアンチセンス遺伝子を導入して OPN 発現を抑えた細胞では、転移結節数が少ないという同様な結果を報告している [Gardner et al., 1994] 。PAP2 における OPN の発現増強は、OPN プロモーター上に新規の ras 活性化型エンハンサーが存在することが見いだされ、これが OPN 転写増強のおきる一つの要因となる。さらに転移関連転写因子である Ets と考えられる転写因子が OPN プロモーターと相互作用することも見出されている [Guo et al., 1995]。ラット乳癌細胞株 (Rama)を用いて、良性腫瘍、転移性悪性腫瘍における OPN 発現を調べた結果、転移性悪性腫瘍細胞株に OPN は多く発現しており、転移と密接に関係していることが示唆されている [Dunnington et al., 1983; Oates et al., 1996]。OPN の転移に関与するメカニズム

は、抗αvβ3 抗体などで細胞を刺激すると転移性が上昇することからインテグリンのシグナル伝達が関係していると考えられる [Albelda et al., 1990; Seftor et al., 1992; Gladson et al., 1991]。骨芽細胞様細胞株においてOPN はビトロネクチンやコラーゲンタイプIよりもFAK 自己リン酸化能が圧倒的に高い。このことは、インテグリン結合によりFAK のリン酸化を介したシグナル伝達においてOPN が重要な役割を果たししていることを示唆している [Liu et al., 1997]。さらに、腫瘍細胞の転移能や悪性度との相関を報告されているCD44v [Naor et al., 1997]とOPN は相互作用することによって、細胞遊走や接着を促進する [Weber et al., 1996; Weber et al., 1997]。OPN 欠損マウスに発癌剤を投与した実験から、野生型マウスに比べ、OPN 欠損マウスの方が腫瘍増殖、進行が早く、一方で転移腫瘍は欠損マウスの方が小さいという現象が見られた [Crawford et al., 1998]。つまり、個体由来OPN はマクロファージ遊走に働き抗腫瘍活性を示し、腫瘍由来OPN はマクロファージ機能を抑制し、転移を促進する機能をもつことが示唆されている。教室のRashid は、OPN が matrix metalloproteinase の発現誘導を行うことをあきらかにしており、これも転移促進の機序の一つであろう[Rashid, 2002]。

1-4. OPN と免疫系

OPN は、活性化T 細胞より発現されるearly T lymphocyte activation-1 (Eta-1)として同定された [Patarca et al., 1989]。Eta-1 はB 細胞をポリクローナルに活性化し、抗体産生を増強するサイトカインとして報告された。Eta-1 遺伝子は *Rickettsia tsutsugamushi* (RT)耐性遺伝子と同じ遺伝子座に位置しており、マウスでは3種のOPN アリルのうち、どのアリルを有するかによってRT に対する反応性が異なる。すなわち、a アリルを有するマウスはRT に対し抵抗性を示すが、他のアリルを有するマウスは感受性を示す [Patarca et al., 1989; Patarca et al., 1993]。結核、珪肺、側頭動脈炎、サルコイドーシス等の肉芽腫性疾患において、組織中の単球、マクロファージ、巨細胞にOPN が発現し、肉芽腫形成に関与するマクロファージ、リンパ球、血管内皮細胞等にOPN が遊走因子として働くことが明らかとなった [Carlson et al., 1997; Nau et al., 1997]。O'Regan らは、T 細胞はOPN に対し接着、遊走能を示し、さらにOPN は抗CD3 抗体と協調してT 細胞を活性化させることを見いだした [O'Regan et al., 1999]。OPN はLPS で刺激したマウスマクロファージに添加するとIL-12 産生を促進、IL-10 産生を抑制し、すなわち、Th1 型サイトカイン産生を高め、Th2 型を抑制するということが示された [Ashkar et al., 2000]。OPN 欠損マウス由来のマクロファージにTh1 型感染症であるherpes simplex virus

1 (HSV-1)、*Listeria monocytogenes* を感染させると、IL-12 産生が低下し、IL-10 産生は上昇した [Ashkar et al., 2000]。IL-12 発現の上昇はリン酸化 OPN とβ3 インテグリンの接着を介して行われ、IL-10 発現の減少は非リン酸化の OPN と CD44 との接着により行われる [Ashkar et al., 2000]。OPN は抗 CD3 抗体との co-stimulatory 作用により T 細胞から IFN-γを産生させ、CD40 リガンド(CD40L) を発現させる。そしてマクロファージから T 細胞依存的に IL-12 を産生させる [O'Regan et al., 2000]。OPN の T 細胞活性化はαvβ3 を介して行われ、IL-2 を産生する [Adler et al., 2001]。これらの事柄を図示すると図 1-4 のようになる。

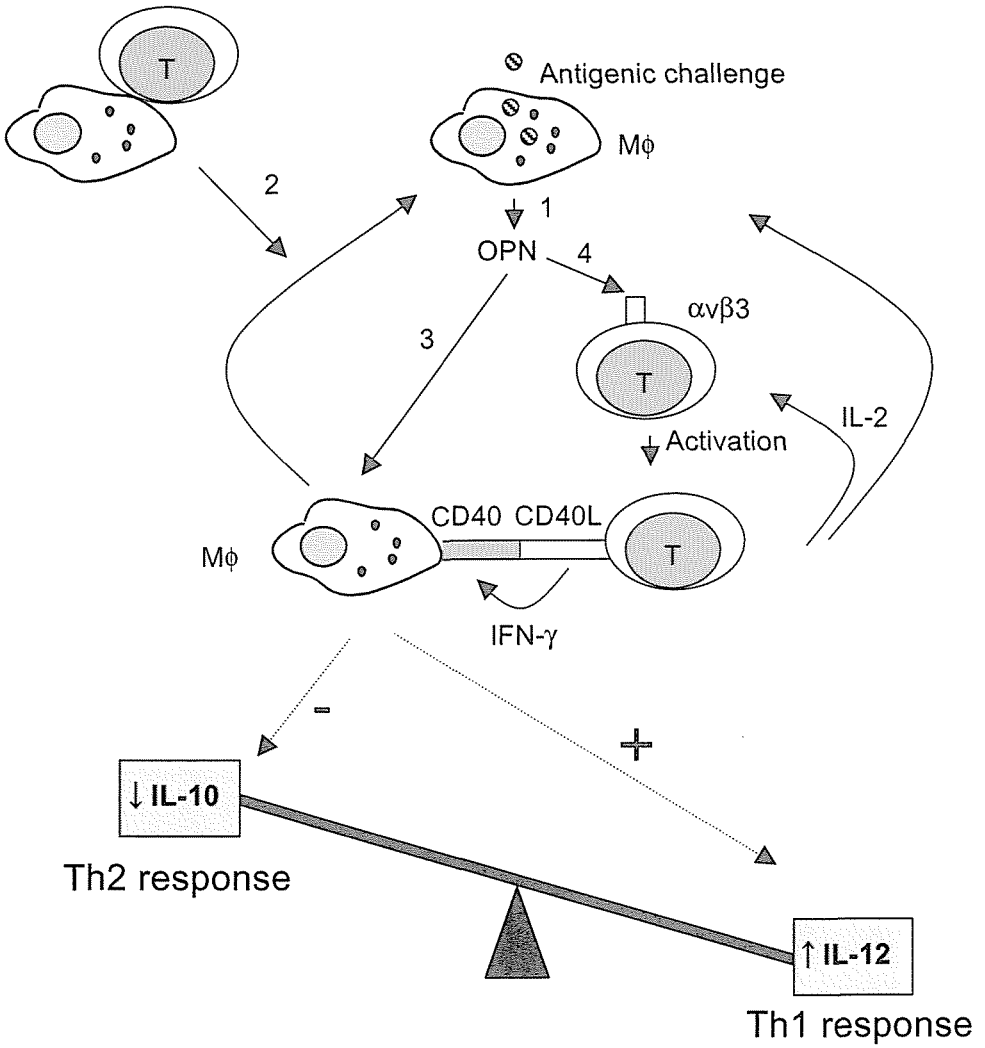


図 1-4. OPN の細胞性免疫への関与

(1) マクロファージが抗原刺激を受けるとOPNを発現し、(2) OPNは、マクロファージやT細胞を遊走させる。(3) OPNはマクロファージを刺激し、IL-10産生を低下させ、IL-12発現を上昇させる。(4) T細胞に対しては、αvβ3を介して活性化させ、活性化T細胞は、IFN-γを産生させ、CD40L を発現するようになり、正のフィードバック機構でマクロファージからのIL-12発現を増強させる。

OPN は自己免疫疾患にも関与する。ハーバード大学のカンター博士のグループや当教室の研究により、全身性エリテマトーデス (SLE) や SLE のモデルマウスである MRL/*lpr* の血清中では OPN が上昇しており、MRL/*lpr* マウスで特徴的に増加する $CD4^-CD8^-$ （ダブルネガティブ）T 細胞が OPN 発現を産生することが明らかになった[Patarca et al., 1990; Katagiri et al., 1995, Mori et al., 1994]。さらに MRL/*lpr* マウスから T 細胞除去後の脾細胞を OPN および LPS で刺激すると IgG や IgM 産生を認める [Mori et al., 1994]。当研究室の飯塚らはリンパ球に発現するようにデザインした OPN トランスジェニックマウスを作製し、その結果、腹腔内 B1 細胞の増加、自己抗体である抗 DNA 抗体が増加していることを見いだした [Iizuka et al., 1998]。

1-5. 全長型 OPN と切断型 OPN

OPN のこのような多彩な機能の調節は、OPN がどの受容体を選択するかによって決まる。しかし、一方で OPN はトロンビンに切断されることにより、これまで隠れていた受容体結合領域が現れ受容体と結合するようになる。OPN 形態によって受容体を選択するという機能調節も行われていと考えられている。炎症性疾患では当然、トロンビンなどのプロテアーゼ活性が上昇していることが予想され、炎症性疾患に関わる OPN はトロンビン切断型であることが推察される。

VEGF は VEGFR-2 を介して αvβ3 の発現を上昇させるが [Soldi et al., 1999]、Senger らは、さらに OPN 発現をも上昇させ、トロンビンによる OPN 切断を促進させ、このトロンビン切断型 OPN は細胞遊走能が全長型よりも上昇していることを見いだしている[Senger et al., 1996]。トロンビン切断型 OPN は細胞接着能が上昇するという報告もあり [O'Regan et al., 1999; Senger et al., 1994] 、全長型 OPN とトロンビン切断型 OPN は機能的な差異が存在することを示唆している。PMA 刺激により活性化した B 細胞は全長型 OPN に比べ、トロンビン切断型 OPN と αvβ3 を介して強く接着するが、ADP やトロンビンにより活性化した血小板は αvβ3 を介して全長型 OPN とトロンビン切断型 OPN とほぼ同様の接着性を示す[Helluin et al., 2000]。これは、細胞に発現するインテグリンの活性化状態によっても、OPN との反応性は異なることを示している。以上のことから、OPN の機能調節は 1) 受容体の選択、2) 受容体の活性化状態、3) OPN 形態、により行われており、これらの事柄が協調し関連しながら多様な OPN の機能を発揮していると考えられる。

本論文では、申請者が筆頭著者として関与した論文 [Kon et al., 2000; Kon et al., 2002]をも

とに、また、共同著者として関与した論文[Shijubo et al., 1999; Takemoto et al., 2000; Takahashi et al., 2001; Gang et al., 2001]をも参考にして、1) OPN 分子内の新たな機能部位の探索、2) 生体 OPN 検出系の作製、3) 臨床への応用の可能性についてまとめた。

第2章　リコンビナントOPN精製タンパク質の作製

2-1. 序

ヒトOPNは選択的スプライシングにより3種のアイソフォームが存在する（図2-1）[Saitoh et al., 1995]。また、分子内にトロンビン切断部位を含むため、生体内ではアイソフォーム以外にトロンビンで切断されたN末フラグメント、C末フラグメントが存在すると考えられる[Senger et al., 1989; Senger et al., 1994]。詳細なるOPNの機能解析のためには、生体内に存在すると考えられるすべてのOPNをリコンビナント体で作製することが必要である。また、OPNは糖鎖付加型タンパク質であるので、培養細胞から精製したリコンビナント体が必要である。本章では、分子生物学的手法により、全てのOPNアイソフォームcDNAのクローニング、トロンビン切断部位を境にしたN末フラグメント、C末フラグメントの構築を行い、大腸菌からglutathion S-transferase (GST) 融合タンパク質として精製し、さらに、CHO-K1細胞由来OPN安定発現細胞株の樹立と、これ由来の糖鎖付加型OPNの精製について述べる。

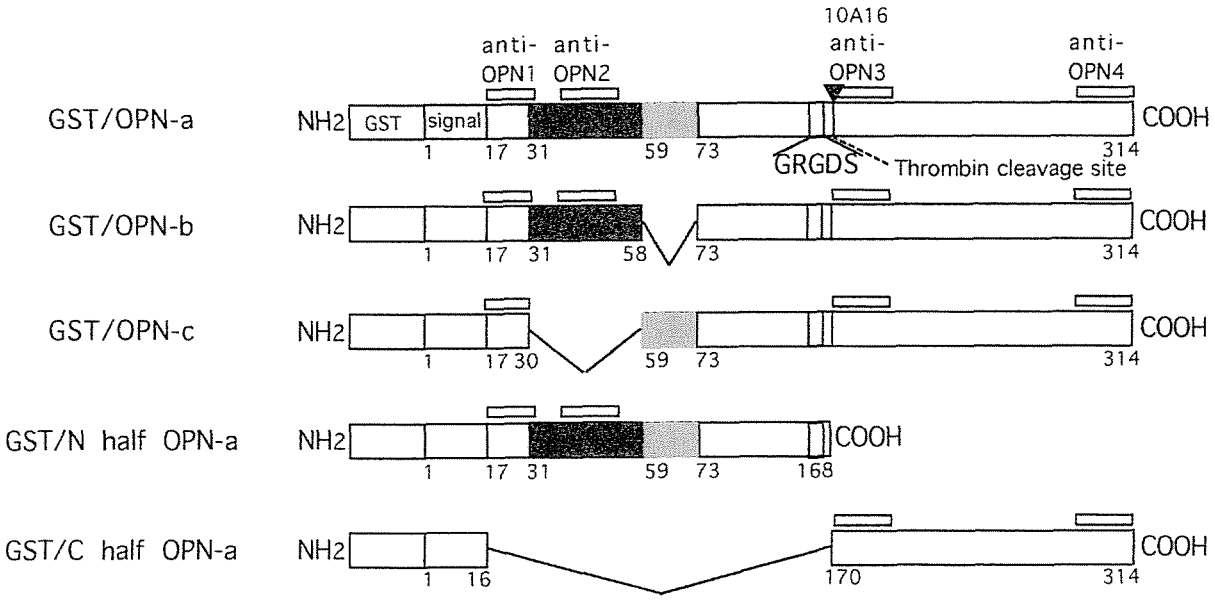


図2-1.　精製したOPNの構造と合成ペプチドの位置
■はOPN-cアイソフォームにおいて、□はOPN-bアイソフォームにおいてそれぞれ欠損している部位を示している。▼はトロンビン切断部位を示している。

2-2. 実験方法

2-2-1. ヒトOPN cDNAのクローニング

腎癌細胞株であるNRC-12細胞よりRNeasy Mini (QIAGEN, Tokyo, Japan)を用いてトータルRNAを抽出し、ランダムプライマーを使用した逆転写により、first-strand cDNAを合成した。報告されているヒトOPNのcDNA配列をもとに、次に示すプライマーを合成し、PCRを行った。

hOPN-5' 5'-CGGGATCCACTACCATGAGAATTGCAGTGATTTGC-3'

hOPN-3' 5'-CCGCTCGAGTTAATTGACCTCAGAAGATGCACTATC-3'

PCR産物をプライマー中に含まれている制限酵素である *Bam*HI と *Xho*I で切り出し、pBlueScript (Stratagene, La Jolla,CA)に組み込んだ。この方法により、OPN-aとOPN-bをクローニングすることができた。

OPN-c cDNAはOPN-a cDNAを鋳型とした二段階PCR法によりクローニングした。このクローニングに用いたプライマーを次に示す。

hOPNct-3' 5'-ACACAGCATTCTTTTCCTCAGAACTTCCAGAATCAGC-3'

hOPNct-5' 5'-TGAGGAAAAGAATGCTGTGTCCTCTGAAGAAACC-3'

第一段階PCRは、hOPN-5'とhOPNct-3'、およびhOPNct-5'とhOPN-3'プライマーで行った。これらのPCR産物を混ぜ、熱処理により一本鎖とし、徐々に冷却することによりアニールさせhOPN-5'、hOPN-3'プライマーで第二段階PCRを行った。第二段階PCR産物をプライマー中に含まれている制限酵素である *Bam*HI と *Xho*I で切り出し、pBlueScriptに組み込んだ。

トロンビン開裂部位よりC末側OPNフラグメント (C half OPN K170-N314) cDNAはOPN-c cDNAのクローニングと同様な二段階PCR法にて作製した。C half OPN cDNA作製に用いたプライマーを次に示す。

hOPNch-3' 5'-TCTTAGATTTGGCACAGGTGATGCCTAGGAG-3'

hOPNch-5' 5'-CACCTGTGCCAAATCTAAGAAGTTTCGCAGA-3'

第一段階PCRは、hOPN-5'とhOPNch-3'、そしてhOPNch-5'とhOPN-3'プライマーで行った。これらのPCR産物を混ぜ、熱処理により一本鎖とし、徐々に冷却することによりアニールさせ、次にhOPN-5'、hOPN-3'プライマーで第二段階PCRを行った。第二段階PCR産物をプライマー中に含まれている制限酵素である *Bam*HI と *Xho*I で切り出し、pBlueScriptに組み込んだ。

トロンビン開裂部位までの N 末 OPN フラグメント (N half OPN M1-R168) cDNA は hOPN-5'プライマーと hOPNnh-3'プライマーを用いた PCR 法により作製した。

hOPNnh-3'　　5'-GCCTCGAGTTACCTCAGTCCATAAACCACACT-3'

PCR 産物をプライマー中に含まれている制限酵素である *Bam*HI と *Xho*I で切り出し、pBlueScript に組み込んだ。

PCR 法により作製した cDNA は全てシークエンス法により配列を確認した。

2-2-2. GST 融合タンパク質の作製

5 種のヒト OPN cDNA は pGEX-4T ベクター (Amersham Pharmacia Biotech, Tokyo, Japan)へ GST (Glutathion S-transferase)タグとフレームが合うように組み込み、GST 融合タンパク質の構築を作製した。これらのプラスミドをそれぞれ大腸菌 JM109 に形質転換し、アンピシリンを添加した LB 培地中で増殖させ、対数増殖期に IPTG を加えタンパク質の発現誘導を行った。大腸菌を回収し、NETN150 バッファー (50mM Tris pH7.2, 1mM EDTA, 150mM NaCl, 0.5% NP-40)にて懸濁、ソニケーターにより可溶化し、遠心後の上清にグルタチオンセファロースビーズ(Amersham Pharmacia Biotech)を加え、4℃にて 2 時間回転混和した。NETN100 バッファー (50mM Tris pH7.2, 1mM EDTA, 100mM NaCl, 0.5% NP-40)にてビーズを洗浄後、還元型グルタチオン (SIGMA CHEMICAL, St Louis, MO) を 50mM 含む 50mM Tris 溶液にて溶出し、精製 GST 融合タンパク質とした。

2-2-3. ヒト OPN 安定発現 CHO-K1 細胞株の樹立

ヒト OPN を恒常的に発現する CHO-K1 細胞を樹立するため、ヒト OPN-a cDNA を pcDNA3.1(+)ベクター (Invitrogen, NV Leek, The Netherlands) へ組み込み、Lipofectamin (GIBCO BRL, Rockville, MD U.S.A.)にて CHO-K1 細胞へ遺伝子導入した。GENETICIN G418 (GIBCO BRL)を 600μg/ml となるように FCS を 10%含む TIL 培地 (IBL, Fujioka, Japan)に添加し、G418 耐性コロニーを 24 穴プレートに移し、上清中の OPN 発現を、確立したサンドイッチ ELISA 系（第 3 章を参照）を用いて調べ、OPN を産生しているコロニーを限外希釈法にて 96 穴プレートにクローニングした。クローンはサンドイッチ ELISA システムにて OPN 産生を調べ、もう一度限外希釈法にてクローニングを行い、CHO-K1 細胞ヒト OPN 安定発現株を樹

立した。

2-2-4. ヒトOPN安定発現CHO-K1細胞株からのヒトOPNタンパク質精製

ヒトOPN安定発現CHO-K1細胞株をCell Factory (NUNC, Roskilde, Denmark)にてG418を600μg/ml、FCSを10%となるように添加したTIL培地を用いて培養し、対数増殖期に培地を無血清培地に交換した。4日間、37℃で培養した上清と、さらに無血清培地を加え、4日間、37℃で培養した上清とを混ぜ、hollow fiberカートリッジ (HIP10-20, Amicon, Beverly MA)を用いた限外濃縮法にて10倍濃縮を行った。最終濃度6Mとなるように尿素を添加し、スタンダードバッファー (50mM Tris-HCl pH7.2, 6M Urea, 0.14 M NaCl)にて平衡化しておいたDEAE-sepharose CL-6Bカラム (Amersham Pharmacia Biotech)にアプライした。スタンダードバッファーでカラム洗浄後、スタンダードバッファーとNaCl濃度を0.7 Mとしたスタンダードバッファーとで濃度勾配溶出を行った。OPNが含まれている画分(OPN画分)は、抗hOPN1ポリクローナル抗体、抗hOPN3ポリクローナル抗体（第3章を参照）を用いたウエスタンブロット法にて確認した。OPN画分を再度DEAE-sepharose CL-6Bカラムにアプライし、同様の操作によって溶出後、OPN画分をポリエチレングリコール20,000 (PEG20,000)にて濃縮を行った。次に、スタンダードバッファーにて平衡化しておいたULTROGEL AcA44カラム (BioSepra Sa, Cergy, France)にアプライし、ゲル濾過法により精製を行った。OPN画分を、RESOURCE RPCカラム(Amersham Pharmacia Biotech, Tokyo Japan)を用いたHPLCシステム (Water, Milford, MA) にて精製を行い、OPNピークを凍結乾燥後、PBSにて再構成を行い、抗OPN4抗体（第3章を参照）をホルミルセルロファイン(Seikagaku Kogyo, Tokyo, Japan)に結合させておいた抗体カラムにアプライした。PBSにてカラム洗浄後、抗体カラム用プレ溶出液（0.5M NaCl / PBS）にて非特異結合分画を溶出し、抗体カラム用溶出液（0.2M Glycine / HCl pH2.5)にて溶出した。OPN画分をPBSに対して透析し、精製ヒトOPNタンパク質とした。

2-2-5. OPNのトロンビン切断

精製OPNタンパク質のトロンビン (SIGMA CHEMICAL) 切断は、5μgの精製タンパク質に0.1-2.0 Unitのトロンビンを添加し、37℃で2時間加温した。

2-3. 実験結果

2-3-1. ヒトOPNタンパク質の精製

大腸菌より精製した種々のGST融合OPNタンパク質、そしてCHO-K1細胞OPN安定発現細胞株の培養上清中 OPN タンパク質を方法の記載に従い精製した OPN タンパク質(CHO/OPN-a)、トロンビン切断したCHO/OPN-a を、SDS-PAGE により分離し、C.B.B.染色により精製度を確認した（図2-2)。

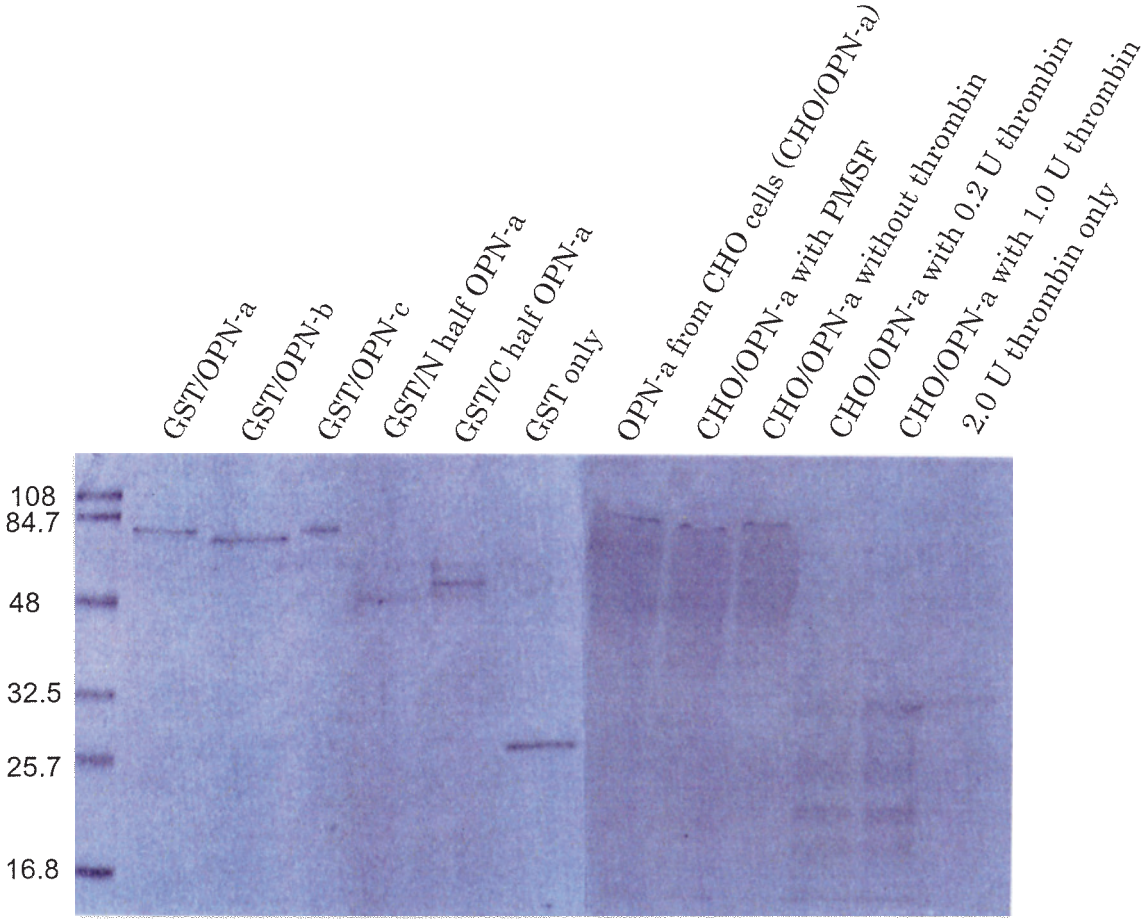


図2-1. 精製OPNタンパク質のタンパク質染色
精製 OPN タンパク質は 5μg/レーンとなるようにアプライし、還元条件下でSDS-PAGE を行った。クマシーブリリアントブルーR-250 にてゲルを染色した。

2-4. 考察

ヒトOPNはスプライシングにより3種のアイソフォームが存在する [Saitoh et al., 1995]。OPN-aは完全な転写が行われた産物、OPN-bはエクソン5の14アミノ酸が欠損した産物、OPN-cはエクソン4の28アミノ酸が欠損した産物である。図2-1で示すCHO由来OPN精製タンパク質は、バンドはブロードとなっているが、これはOPNの糖鎖付加、リン酸化などの翻訳後調節によるものと思われる [Denhardt et al., 1993; Saavedra., 1994; Sorensen et al., 1995]。OPNはトロンビン切断部位を分子内のほぼ中央にもつ。CHO由来OPNをトロンビンにて切断すると分子量が約半分となったことから、精製物がOPNであるということを定性的に確認することができた。これら種々のOPNタンパク質を精製できたことにより、OPN検出系の構築が可能となった。つまり、スタンダードとなる物質の精製ができたことになる。また、OPN機能を直接的に調べることが可能となる材料を作製できたことになる。次章では、これらのリコンビナントOPNタンパク質を用い、検出系、測定系の確立に関して記す。

第3章　ヒトOPNに対する多様な検出系、定量系の確立とOPN産生形態の解析

3-1. 序

OPN の機能はどの受容体に結合するかにより調節されている。OPN 分子内には複数の細胞接着部位が存在し、トロンビン切断型OPNは、全長型OPNと共通の受容体の他に異なる受容体と結合する。さらに、ヒトでは3種類のアイソフォームが存在し、aアイソフォームに比し、bおよびcアイソフォームは、分子の一部が欠損している。このように、生体内でのOPN存在様式は多種多様であることが予想され、疾患においてどのような形態のOPNが産生されているかを把握することはきわめて重要となる。

OPNに対するモノクローナル抗体は、mAb87-BとmAb53 [Bautista et al., 1994]、MPIIIB10 [Gorski et al., 1990]が報告されているが、いずれも全長OPNを免疫して得られた抗体であり、抗体の認識するエピトープは不明である。これまで報告されているOPNを測定するELISA系は、大腸菌由来のリコンビナントOPNを免疫して得られたポリクローナル抗体とmAb53とを組み合わせたサンドイッチELISA系があるが、この系は認識エピトープが不明であり、生体内に存在するトロンビンで切断されたOPNを認識することはできない。しかも、これまで報告された抗体は、ヒトOPNアイソフォームとの反応性も不明である。本章では、免疫原に合成ペプチドを用い、エピトープが判明している抗OPN抗体を4種作製し、これらの抗体を用いて検出系、定量系の構築を行った。これらの検出系、定量系の特異性は、第2章で精製した種々のOPNを用いて確認した。

3-2. 実験方法

3-2-1. 合成ペプチドを用いた抗ヒトOPNポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の作製

抗ヒトOPN抗体を作製するために免疫に使用した合成ペプチド配列を次に示す。OPN上のペプチド位置は、図2-1に示している。

hOPN1 : IPVKQADSGSSEEKQ : I17-Q31

hOPN2 : NKYPDAVATWLNPDPSQ : N34-Q50

hOPN3 : KSKKFRRPDIQYPDATDE : K170-E187

hOPN4 : KHLKFRISHELDSASSEVN : K296-N314

これらのペプチドは架橋剤として N-(6-maleimidocaproyloxy)-succinimiode (EMCS)を使用し thyroglobulin と結合させ、初回はフロイント完全アジュバントで、以降はフロイント不完全アジュバントで乳化後、ウサギにそれぞれ 100μg/匹免疫した。

ウサギは、血清がペプチドに対する抗体価上昇を認めた後に採血し、免疫した合成ペプチドをチオールセファロースビーズ(Amersham Pharmacia Biotech)に結合させたカラムにアプライし精製した。PBS に対して透析後、精製ポリクローナル抗体とした。

hOPN3 はマウスに対して 50μg/匹で免疫を行い、次に示すようにモノクローナル抗体作製を行った。血清のペプチドに対する抗体価上昇を認めた後、脾臓を摘出し、脾細胞と X63-Ag8-653 とをポリエチレングリコールによる細胞融合を行い、HAT 培地にて選択培養を行った。ハイブリドーマのコロニー形成が認められた後に、抗原ペプチドを固相した ELISA 法にてスクリーニングを行い、陽性コロニーは二回限界希釈法を繰り返すことによって、シングルクローンを得た。シングルクローンの培養上清をポリクローナル抗体と同様に精製を行い、リコンビナント OPN との反応性で、最終スクリーニングを行った。その結果、10A16 を選抜した。

3-2-2. ウエスタンブロット解析

精製した OPN は 100 ng/レーンとなるように調整し、尿は原液、培養上清は 15 倍濃縮物 10μl にそれぞれ等量の泳動バッファー (125mM Tris/HCl pH6.8, 4% SDS, 20% Glycerol, 10% 2-Me, 0.02% BPB) を添加し、3 分間煮沸後、12% ポリアクリルアミドゲルにアプライし SDS-PAGE を行った。PVDF 膜 (Millipore, Tokyo, Japan)に転写、ブロッキング液 (3% milk, 1% BSA, 0.1% Tween-20, 0.05% NaN_3 / PBS) にてブロッキング後、抗体濃度 5.0 μg/ml となるように抗体を添加した。0.1 % Tween20/PBS にて洗浄後、HRP 標識してある抗ウサギ IgG、または抗マウス IgG (IBL) を加え、ECL システム (Amersham pharmacia biotech)にて発光させ、X 線フィルム (Fuji Photo Film, Tokyo, Japan)に感光させた。

3-2-3. サンドイッチ ELISA システムの確立

96 穴プレートに抗 OPN1 抗体、抗 OPN2 抗体、抗 OPN4 抗体を 0.1M 炭酸バッファーpH9.5 を用いて 20μg/ml の濃度に希釈、各ウェルに 100μl 固相し、4℃一晩静置した。その後、1% BSA/PBS/0.05% NaN3 にてブロッキング後、CHO 細胞から精製した OPN をスタンダードとして固相プレートに加えた。37℃一時間加温した後、洗浄液(0.05% Tween20/PBS)にてプレートを洗浄し、HRP ラベルした抗 OPN1 抗体、抗 OPN3 抗体、または 10A16 を添加した。4℃ で 30 分反応後、洗浄液で充分に洗浄したプレートに、TMB 液 100μl を添加し 30 分室温に静置して発色させた。反応終了後、1N H_2SO_4 を 100μl 添加し、反応を停止させ、BioRad プレートリーダーにて 450nm の吸光度を測定することにより、定量化した。

3-2-4. 細胞培養

本研究で用いた次に示す細胞は全て（株）免疫生物研究所より供与された。

PC-9	[Kinjo et al, 1979]	：肺癌（分化型腺癌）
PC-10	[Kinjo et al, 1979]	：肺癌（中等度分化型偏平上皮癌）
NRC-12	[Komatsubara et al,1978]	：腎癌（腎細胞癌）
HepG2	[Imai et al, 1999]	：肝癌（肝細胞癌）
SEKI	[Mori et al, 1991]	：皮膚黒色腫
U-937	[Okada et al, 1995]	：組織球性リンパ腫
HL-60	[Sekiya et al, 1994]	：前骨髄性白血病

HepG2 細胞は、FCS を 10 %含む Dulbecco MEM 培地 (IBL)を、その他の細胞は FCS を 10% 含む TIL 培地を使用した。U937 と HL60 の PMA 処理は、最終濃度が 0.1 nM となるように添加した。OPN 発現解析に用いた培養上清は、細胞を 6 穴プレートに 2.0×10^5 個/ml となるように加え、二日間培養を行ったものを使用した。

3-2-5. 尿サンプルの採取方法

健常人（年齢 24-42 歳、平均年齢 30.44 歳）の尿サンプルは、起床後朝一番のものを使用した。全てのサンプルは採取後すぐにドライアイスで凍結させ、必要時まで-80℃で保存した。必要時に室温で融解させ、即座にウエスタンブロット解析、ELISA 解析に使用した。

3-2-6. クレアチニンの測定方法

クレアチニンの測定は、クレアチニン-テストワコー (WAKO, Osaka, Japan)を使用した。尿サンプル 0.5 ml に除蛋白液（タングステン酸・硫酸溶液）を 3.0 ml を撹拌しながら添加し、室温で 10 分間放置した。遠心分離した上清 2.0 ml にピクリン酸試液、0.75N 水酸化ナトリウム溶液を 1.0 ml づつ加え、25℃の水槽中で 20 分間放置した。520nm の吸光度を測定することにより、定量化した。

3-3. 実験結果

3-3-1. 合成ペプチドに対する抗体の特異性

実験方法の項で記載したヒト OPN 内の合成ペプチド OPN1、OPN2、OPN3、OPN4 をウサギに免疫することにより抗ヒト OPN 抗体を作製し、それぞれの抗体の特異性は、第 2 章で作製した種々のヒト OPN リコンビナントタンパク質を用いて確認した (図 3-1)。抗 OPN2 抗体は、アイソフォーム a、b は検出できたが、アイソフォーム c を検出できなかった。その他すべての抗体はアイソフォーム a、b、c を検出することができた。また、抗 OPN1 抗体、抗 OPN2 抗体は N half を検出できたが、C half は検出できなかった。抗 OPN3 抗体、抗 OPN4 抗体は C half を検出できたが、N half は検出できなかった。全ての抗体は GST のみとは、反応しなかった。ウエスタンブロットにおいて、抗 OPN3 抗体が最も OPN を強く検出したので、同抗原ペプチドをエピトープとしたマウスモノクローナル抗体を方法に従い作製した。クローン 10A16 が選抜され、抗 OPN3 抗体と同様な反応性が見られた（図 3-1)。

これまでは、大腸菌から作製した GST タンパク質で反応性を調べていたが、OPN は糖鎖付加型タンパク質であるので、OPN 安定発現 CHO-K1 細胞より精製した OPN-a (CHO/OPN-a) との反応性を調べた。その結果、全ての抗体が検出することができた（図 3-1)。OPN はトロンビン切断部位を含んでおり、生体内にはトロンビン切断型 OPN も存在していると考えられているので、CHO/OPN-a にトロンビンを添加し、反応性を調べた。その結果、予想される分子量にバンドを検出することができた（図 3-1)。

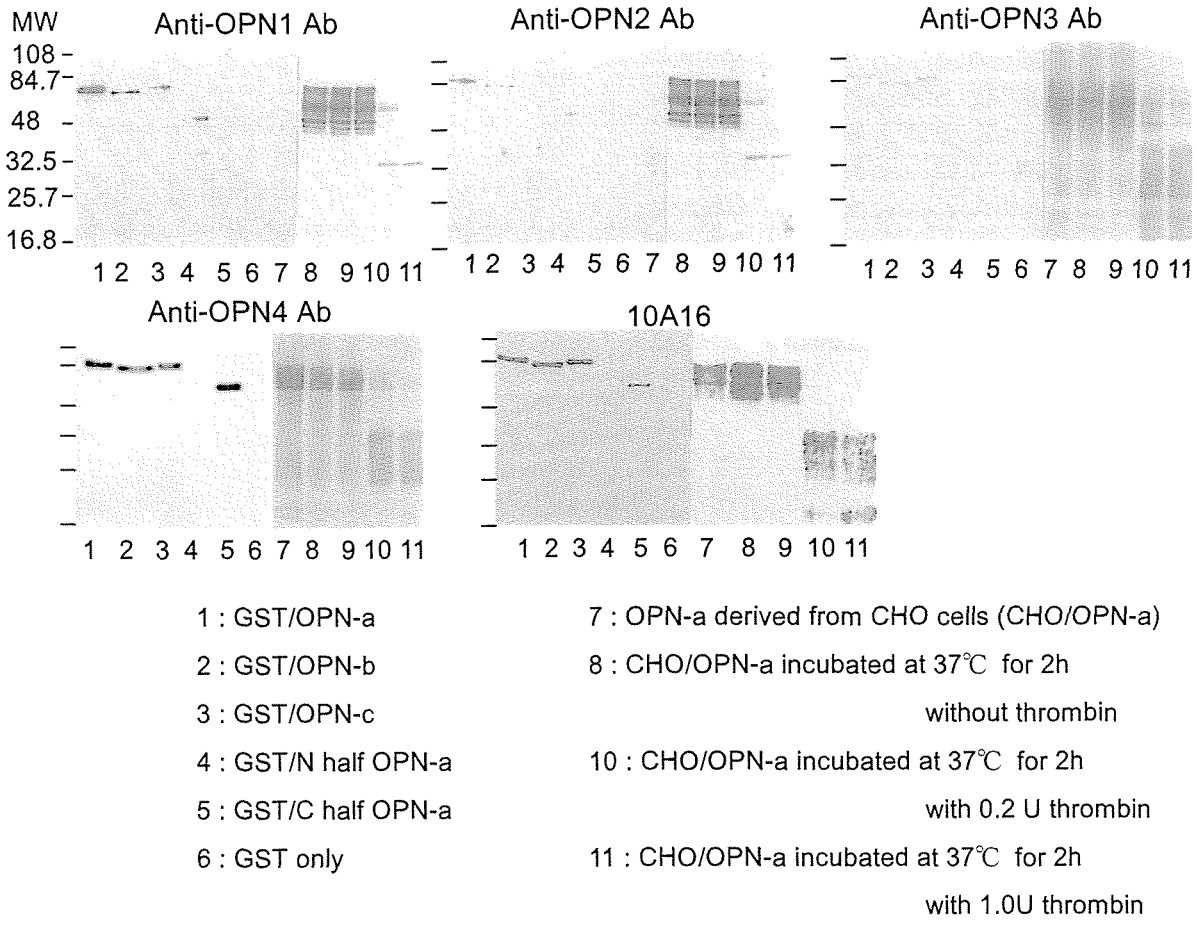


図 3-1. 種々の OPN 精製タンパク質に対するポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のウエスタンブロット法による特異性試験

3-3-2. ヒト OPN に対するサンドイッチ ELISA 系の構築

OPN 分泌形態と OPN 分泌量との相関を調べるため、抗 OPN1 抗体、抗 OPN2 抗体、抗 OPN4 抗体を固相し、抗 OPN1 抗体、抗 OPN3 抗体、10A16 を HRP 標識し、これらの組み合わせにより次に示す 6 種のサンドイッチ ELISA 系を作製した（図 3-2)。抗 OPN4 抗体固相-抗 OPN1 抗体標識、抗 OPN4 抗体固相-抗 OPN3 抗体標識、抗 OPN2 抗体固相-抗 OPN1 抗体標識、抗 OPN2 抗体固相-抗 OPN3 抗体標識、抗 OPN1 抗体固相-抗 OPN3 抗体標識、抗 OPN1 抗体固相-10A16 標識をそれぞれ 4-1 系、4-3 系、2-1 系、2-3 系、1-3 系、1-Mono 系と示す。これらの系のスタンダードカーブを図 3-3 に示す。これらの系の特異性を種々の GST 融合 OPN タンパク質にて調べた（図 3-4)。4-1 系、1-3 系、1-Mono 系は、全長 OPN である a、b、c アイソフォ

ームを測定できたが、N half、C half は検出できなかった。4-3 系は a、b、c アイソフォームに加え、C half を測定できたが、N half は検出できなかった。2-3 系は全長 OPN である a、b アイソフォームを測定できたが、c アイソフォーム、N half、C half は検出できなかった。2-1 系は a、b アイソフォーム、N half を測定できたが、c アイソフォーム、C half は検出できなかった。

3-3-3. 培養細胞上清中 OPN の検出

7 種の細胞株培養上清中 OPN の発現を、サンドイッチ ELISA 法にて解析した(図 3-5)。U937 と HL60 は全ての ELISA 系にて検出できなかったが、PMA 刺激により OPN 産生が認められるようになった。HepG2 は、2-1 系に比べ 4-3 系にて 10 倍以上高い OPN 産生を認めた。NRC-12 は 2-3 系が最も多く測定され、4-1 系が最小の測定値であった。SEKI は、1-Mono 系では測定値が低かったが、他の系では同等の測定値を示した。PC-9 は、NRC-12 と同じタイプの OPN 産生を、PC-10 は HepG2 と同じタイプの OPN 産生を示した。

OPN 産生形態に細胞株間で差異が認められたため、次にウエスタンブロット法にて、培養上清中 OPN の産生を解析した（図 3-7)。全ての抗体が NRC-12、HepG2、SEKI の培養上清から産生される OPN を検出している。PC-9、PC-10 の培養上清から産生される OPN は、抗 OPN3 抗体、抗 OPN4 抗体のみが検出している。U937、HL60 の培養上清中 OPN は PMA 刺激した上清のみに、抗 OPN3 抗体、抗 OPN3 抗体と抗 OPN4 抗体でそれぞれ検出している。

3-3-4. 尿中 OPN の検出

9 人の健常人から採取した尿を用いて、尿中 OPN をウエスタンブロット法にて解析した（図 3-7)。全ての抗体が、尿中 OPN を 40-70 kD の分子量に検出することができた。低分子量の位置にバンドは認められなかった。

サンドイッチ ELISA 法にて尿中 OPN の産生を検討した（図 3-8)。尿中 OPN の産生量は尿量と反比例するという報告があるため [Min et al., 1998]、標準的な尿中タンパク質であるクレアチニンで測定値を補正している。全てのサンプルが、4-3 系の測定値が低く、2-1 系の測定値が高いという結果が見られた。

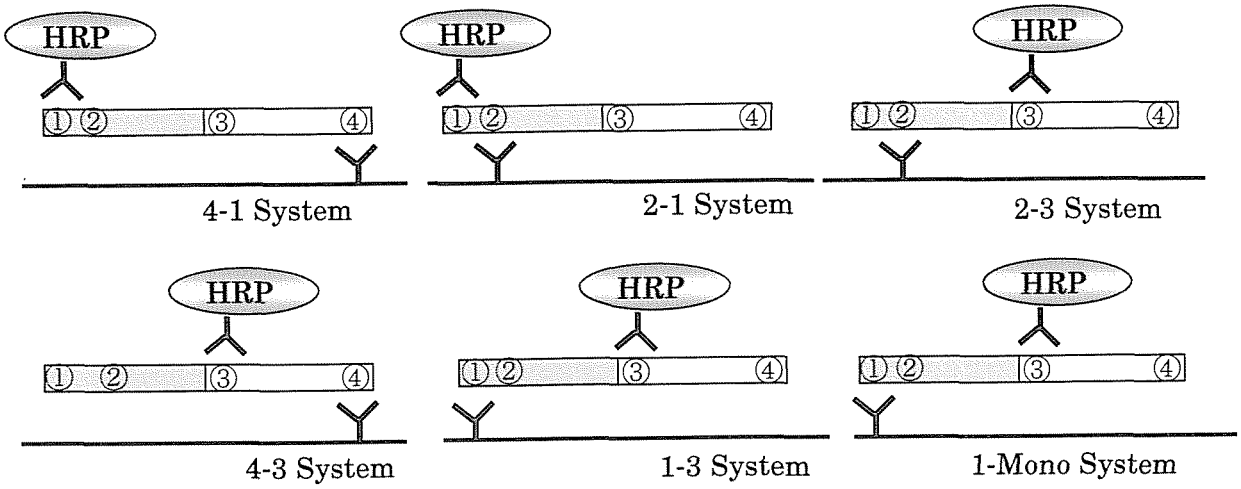


図 3-2. OPN サンドイッチ ELISA 系

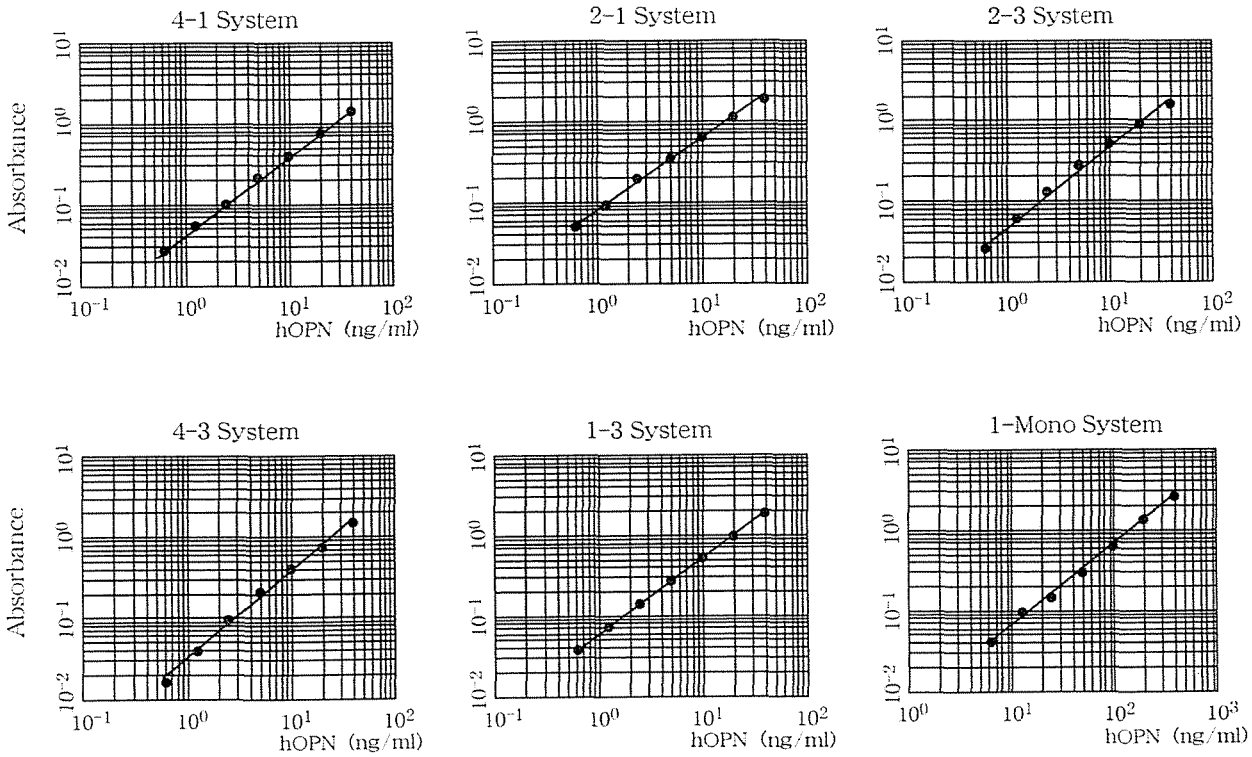


図 3-3. OPN ELISA 系のスタンダードカーブ

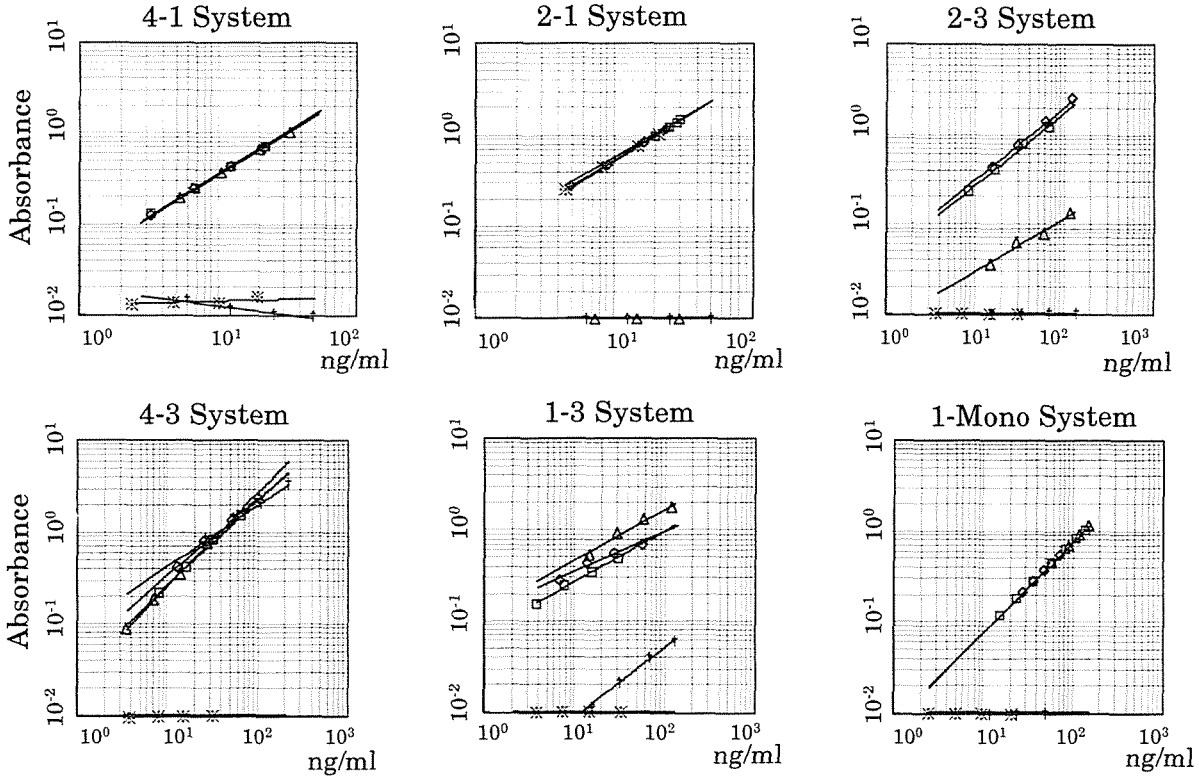


図 3-4. OPN ELISA 系の特異性試験
GST/OPN-a、GST/OPN-b、GST/OPN-c、GST/N half OPN-a、GST/C half OPN-a をそれぞれ、□、◇、△、※、†で示している。

3-4. 考察

OPN は、高度にリン酸化された糖タンパク質である。ヒトでは最低 3 種のスプライシングアイソフォームが存在し、OPN-a、OPN-b、OPN-c と呼ばれている [Saitoh et al., 1995]。すなわち、OPN-a は cDNA が完全に翻訳された形、OPN-b は exon 5 が欠損した形、OPN-c は exon 4 が欠損した形である。さらに、OPN 分子内には、トロンビン切断部位が存在しトロンビン切断型 OPN が存在することを考えると、OPN の生体内における存在形態は多様であることが予想される。OPN と疾患との関連が近年多く報告されているが、OPN 形態を含めてまでの解析はほとんど行われていない。これは、OPN 形態を区別できるような検出系、測定系が確立されていないことが原因と思われる。

本章において作製した抗体は、リコンビナント OPN 以外にも、細胞株から産生される OPN、

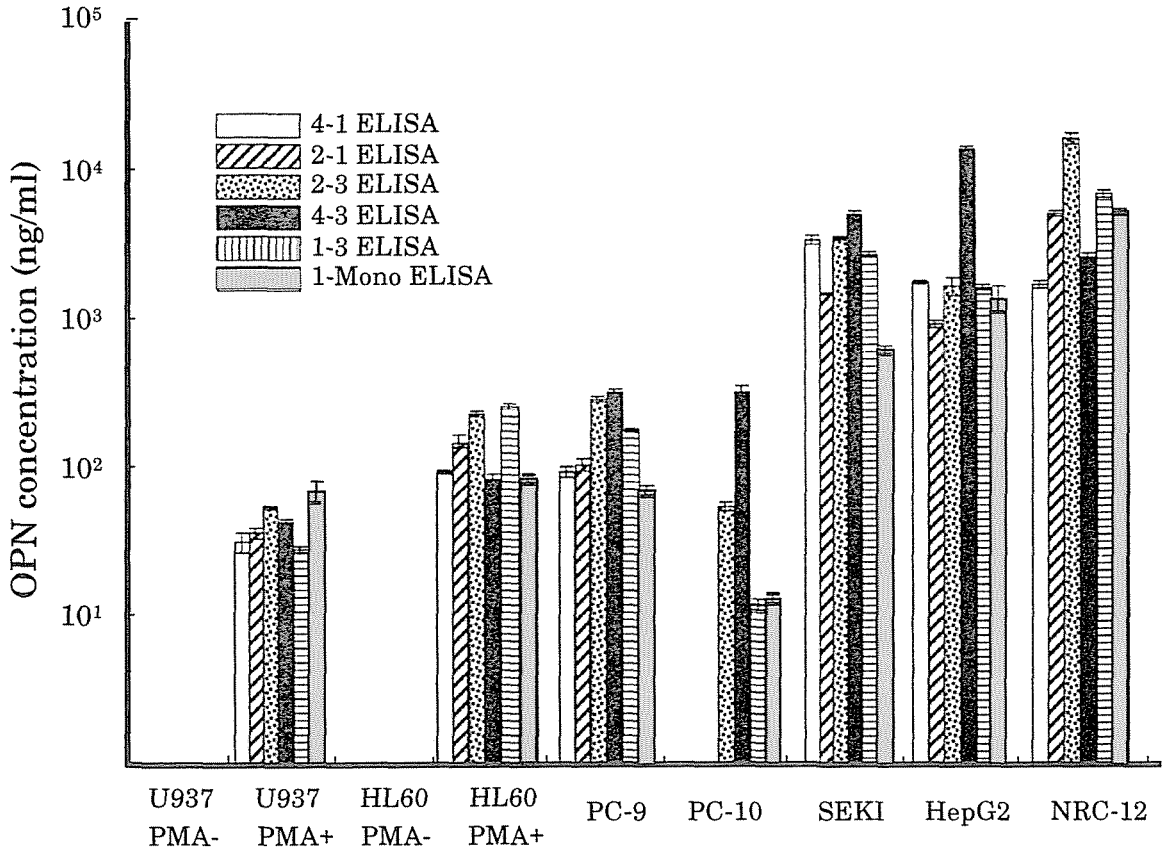
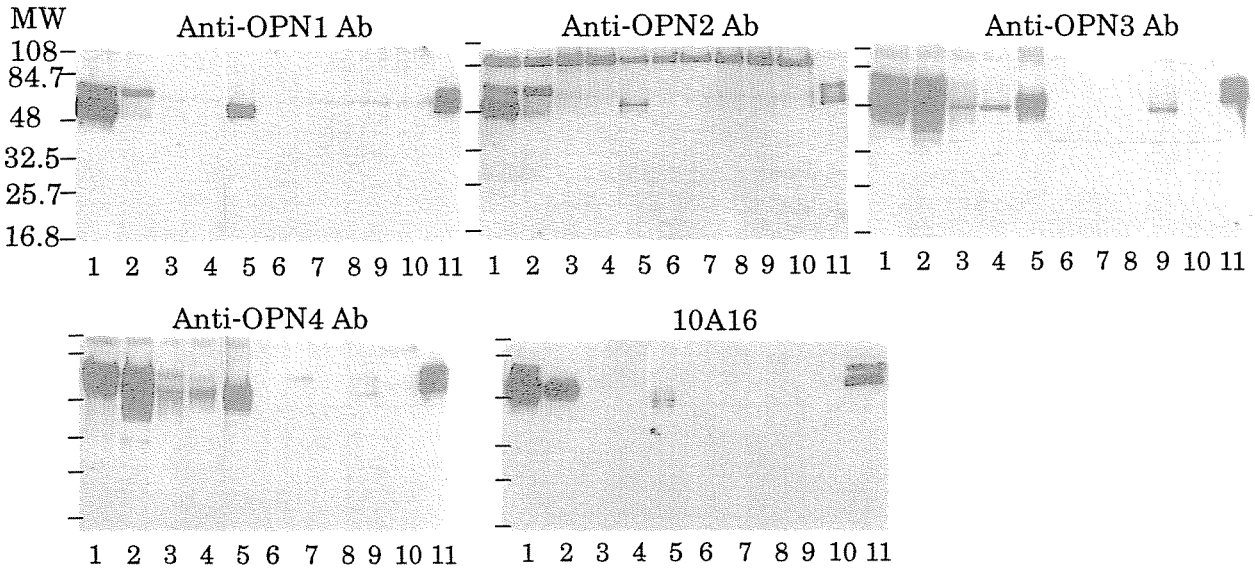


図 3-5. 腫瘍細胞株から分泌される OPN の測定

uropontin とも呼ばれる尿中 OPN などの生体内に存在する OPN も検出することができた。過去にヒト OPN に対する二種のモノクローナル抗体、mAb87-B、mAb53 が報告されているが、ともにリコンビナント OPN を免疫原として作製された抗体である。mAb87-B はトロンビン切断 OPN を検出できるが、mAb53 はトロンビン切断 OPN を検出できない。MPIIIB10 はラットの骨由来 OPN を免疫して得られた抗体であり、ヒト OPN とも交差反応性を示す。mAb87-B、mAb53、MPIIIB10 はすべてエピトープが不明である。詳細なる OPN 研究のためには、エピトープ部位が判明しており、どの形の OPN が検出可能かを確認しておく必要がある。本研究に用いている抗体は全て合成ペプチドに対する抗体であるので、エピトープは判明している。実際の抗体特異性は図 3-1 に示しているように、エピトープから考えられる反応性と一致する。全ての抗体は CHO 由来 OPN を検出することができ、糖付加に関係なく反応することが分かった。CHO 由来 OPN のバンドが約 40-80 kDa にブロードに出ているが、これは、第 2 章で記したように、転写後調節による糖、リン酸付加が原因と思われる。トロンビン切断した OPN も検出可能であった。トロンビン切断型 OPN はより OPN 機能を促進するという報告もあることから、これらの抗体はトロンビン切断型の N 末、あるいは C 末フラグメントかを区別して検出することがで



1 : NRC-12 cells
2 : HepG2 cells
3 : PC-9 cells
4 : PC-10 cells
5 : SEKI cells
6 : U937 cells
7 : U937 cells stimulated with PMA
8 : HL60 cells
9 : HL60 cells stimulated with PMA
10 : culture medium containing 10% FCS
11 : purified OPN-a derived from CHO cells

図 3-6. 腫瘍細胞株から分泌されるOPNのウエスタンブロット解析

きるため、OPN 機能解析において重要な材料となる。抗 OPN3 抗体、抗 OPN4 抗体、10A16 から検出されたトロンビン切断型 OPN の C 末フラグメントは、ブロードなバンドがみられる。これは、C 末側フラグメントがトロンビン、または、他の酵素に感受性が高い可能性が考えられる。一方、トロンビン切断された N 末側フラグメントは抗 OPN1 抗体、抗 OPN2 抗体で一本のバンドが得られており、抗 OPN3 抗体、抗 OPN4 抗体に見られたようなブロードなバンドは見られない。これは、N 末フラグメントはα9β1のリガンドとなりうるので、機能的に重要な部位であることによると推察される。つまり、生体内において OPN がトロンビンで切断されると、機能的に重要な N 末フラグメントは保存され、機能的に不必要な C 末フラグメントは積極的に消化されるのかもしれない。

OPN に対する 6 種のサンドイッチ ELISA 系を構築することができた。腫瘍細胞株の培養上清中 OPN をこれらの ELISA 系を用いて解析した結果、細胞間により顕著な OPN 形態の差を見いだすことができた。すなわち、NRC-12、PC-9 では、N 末と C 末が欠損している OPN が存在するが、大多数は全長を発現していると考えられ、HepG2 と PC-10 では、全長に比べ N 末が欠損した形の OPN が有意に多く存在していることが考えられた。PC-10 に関してはほとん

ど全てのOPNがN末を欠損しており、HepG2に関しては10倍程度全長に比べ欠損型が多かった。U937とHL60に関しては、PMA刺激後のみにOPN産生が認められた。これは、過去の報告と一致している[Atkins et al., 1998]。ウエスタンブロットを用いた培養上清の解析では、NRC-12は、全ての抗体で同様なOPNのバンドが見いだされているが、HepG2では、抗OPN3抗体、抗OPN4抗体で見出される48kDa周辺のバンドが抗OPN1抗体、抗OPN2抗体では見いだすことができない。48 kDa周辺に見出されるOPNのバンドが、N末を欠損したOPNであり、このOPN形態の存在により、4-3系でHepG2中OPNが高く測定されるようになったと推察される。

尿中OPNの存在形態を、各種サンドイッチELISA系で調べたところ、4-1系、4-3系、2-1系、2-3系、1-3系、1-Mono系の測定値(μg/ml)をクレアチニン値(mg/dl)で割ることにより補正した平均値は、それぞれ、16.1±3.4、7.7±1.9、27.5±5.2、16.1±3.9、19.1±3.8、24.6±5.6であった。最大値は、N末フラグメントを検出する2-1系で27.5、一方、最小値はC末フラグメントを測定する4-3系で7.7である。この結果は尿中OPN(uropontin)は酵素切断を受けており、C末フラグメントは不安定のため、測定値が低くなるという可能性を示している。このことは、CHO由来リコンビナントOPNを用いたトロンビン切断型C末フラグメントのバンドがブロードとなり、N末フラグメントのバンドが一本なのと対照的である結果からも支持できる。

大腸菌由来のリコンビナントOPNを免疫して得られたポリクローナル抗体とmAb53とを組み合わせたサンドイッチELISA系を用いて、閉経前後の健常人女性の血漿中OPN値、および、結石患者と健常人との尿中OPN値を調べたところ差はみいだせなかったことが報告されている[Bautista et al., 1996a; Bautista et al., 1996b]。しかしながら結石患者尿中にプロテアーゼ切断による低分子OPNが存在していることが確認されており[Bautista et al., 1996b]、このことは、低分子OPNを測定できるELISA系を用いれば、結石尿患者と健常人中OPN値は異なる可能性があることを示唆している。Singhalらは、同ELISA系を用いて、転移性乳癌患者中血漿でOPN値が有意に上昇していることを見いだし[Singhal et al., 1997]、OPNは転移性乳癌の診断に使える可能性があることを示唆している。転移性腫瘍にはトロンビン切断型OPNが有意に上昇していることが報告されており[Senger et al., 1988]、トロンビン切断型OPNを測定できれば、より感度良く差異を見いだすことができる可能性がある。つまり、本ELISA系を組み合わせて用いることにより、OPN形態と疾患との関連を詳細に、さらに効率的に解析できるようになる可能性を含んでいる。

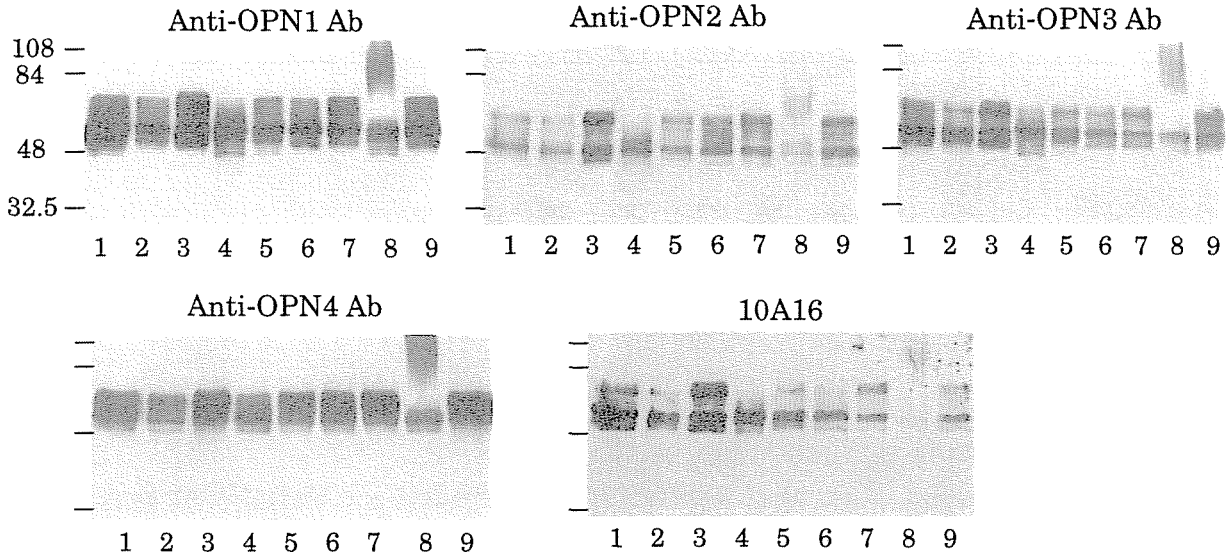


図 3-7. 尿中 OPN のウエスタンブロット解析
尿は各レーンあたり原液 10μl アプライし、SDS-PAGE で分離後、各抗体で検出している。

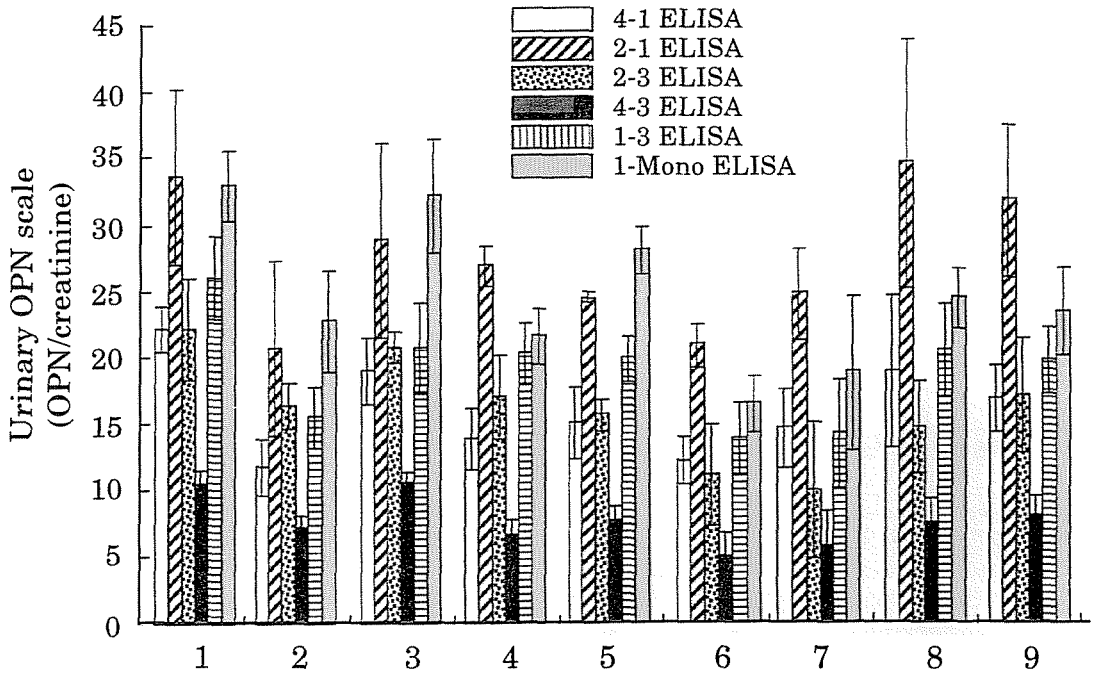


図 3-8. 尿中 OPN の ELISA 系を用いた検出
データは、OPN 値（μg/ml）をクレアチニン値（mg/dl）で割ることにより算出している。データは三度の実験の平均値を示している。

第 4 章　OPN 内機能部位の探索

4-1. 序

OPN は序論に示したように多彩な機能を有しているが、この機能的差異は、多くの OPN 受容体により調節されていると考えられている。平滑筋細胞においては、αvβ3、αvβ1、αvβ5 インテグリンが RGD 配列を介して細胞接着に関わっているが、αvβ3 のみが細胞遊走に関わっている [Liaw et al., 1995]。悪転移性乳癌細胞株ではαvβ3 に、低転移性乳癌細胞株では、αvβ5/β1 に依存して細胞遊走が行われる [Tuck et al., 1999; Tuck et al., 2000]。α9β1、α4β1、α4β7は、SVVYGLR 配列を介して OPN と接着する。また、CD44 も RGD 以外の配列を介して OPN と接着している。α9β1 は全長 OPN には結合しないが、トロンビンで切断されて、露出した SVVYGLR 配列と結合する。OPN 内機能部位を探索するために、合成ペプチドを免疫原として 10A16 を含めた 5 種のモノクローナル抗体を樹立し、さらに、London Regional Cancer Centre の Ann F. Chambers 教授からご供与頂いた mAb53 抗体を含め、これら計 6 種のモノクローナル抗体について特異性試験を含めた機能解析を行った。その過程で、VDTYDGRGDSVVYGLRS ペプチドに対する抗体である 2K1 が、RGD 依存性細胞接着を阻害し、SVVYGLR 依存性細胞接着であるα9β1 との接着において阻害能を有することが明らかとなった。さらに 2K1 は、全長型 OPN、トロンビン切断型 OPN の細胞遊走活性に対しても阻害活性を有することが明らかとなった。一方、mAb53 [Bautista et al., 1994]は、全長型 OPN の RGD を介する細胞接着、および細胞遊走を阻害したが、トロンビン切断型の細胞遊走は阻害できなかった。これら二つの抗体のエピトープを詳細に解析することにより、OPN 内機能部位を決めることができると考え、ペプチドを固相した ELISA 法にて解析を行った。その結果、2K1 は SVVYGLR 配列を、mAb53 はトロンビン切断部位を含む GLRSKS 配列を認識していることが判明し、これらの配列が、OPN の細胞接着や遊走に重要であることが明らかとなった。

4-2.　実験方法

4-2-1.　マウス、ラット OPN タンパク質の精製

マウス OPN cDNA は、当研究室の片桐らがクローニングしているものを使用した[Katagiri et al, 1996 ; Katagiri et al, 1999]。

ラット OPN cDNA はヒト OPN cDNA と同様な方法によって正常腎細胞株である NRK-52E からクローニングした。

マウス OPN、ラット OPN をそれぞれ恒常的に発現する CHO-K1 細胞をヒト OPN と同様な方法によって樹立し、マウス OPN、ラット OPN タンパク質をヒト OPN タンパク質と同様な方法により精製した。

4-2-2. 合成ペプチドを用いた抗ヒト OPN モノクローナル抗体の作製

抗ヒト OPN 抗体を作製するために免疫に使用した合成ペプチド配列を次に示す。

hOPN1 : IPVKQADSGSSEEKQ : I17-Q31

hOPN4 : KHLKFRISHELDSASSEVN : K296-N314

hOPN5 : VDTYDGRGDSVVYGLRS : V153-S169

hOPN6 : IDSQELSKVSREFHS : I261-S276

これらのペプチドは架橋剤として EMCS を使用し thyroglobulin と結合させ、初回はフロイント完全アジュバントで、以降はフロイント不完全アジュバントで乳化後、マウスにそれぞれ 50μg/匹免疫した。モノクローナル抗体の樹立は第 3 章で示した方法に従って行った。その結果、OPN1、OPN4、OPN5、OPN6 からそれぞれクローン 5A1、1B20、2K1、4C1 を選抜した(図 4-1)。

4-2-3. ウエスタンブロット解析

第 3 章で示した方法に従い行った。

4-2-4. 細胞培養

次に示す細胞は（株）免疫生物研究所より供与された。

NRK-52E [Noda et al, 1987]　　：正常腎細胞

TIG-7　[Ohsawa, 1989]　　：線維芽細胞

FCS を 10 %含む TIL MediaI 培地(IBL)を使用した。

4-2-5. 細胞接着阻害試験

OPN の RGD を介する細胞接着にはヒト線維芽細胞株である TIG-7 を用いた。CHO-K1 細胞由来ヒト OPN 精製タンパク質を濃度 10μg/ml から二倍連続希釈で 50μl/ウェルとなるように 96 穴プレートに固相を行い、37℃ 1 時間反応させた。ブロッキング液 (0.5% BSA/PBS/0.05% NaN3) を 200μl/ウェル加え、室温で 1 時間放置した。PBS でプレートを 3 回洗浄後、200μg/ml となるように PBS で希釈した抗体を 50μl/ウェル加え、37℃ 1 時間反応させた。反応終了後、TIG-7 を 0.25% BSA を含む D-MEM で 2.0×10^5 個/ml となるように調整し、各ウェルに 200μl づつ添加、37℃ 5% CO2 下で約 1 時間培養を行った。抗体を加えていないウェル中の細胞が、プレートに接着、伸長していることを確認後、上清を取り除き、37℃に加温しておいた 0.25% BSA を含む D-MEM で 3 回洗浄した。0.25% クリスタルバイオレット (WAKO, Osaka, Japan) 添加 20% メタノールを 50μl 各ウェル中に加え、室温に 30 分間放置することにより細胞を固定、染色を行った。蒸留水でプレートを充分に洗浄後、20%酢酸水を 100μl/ウェル加え、細胞を溶かし色素を放出させ、吸光度 590nm を測定することにより、細胞接着活性を調べた。

OPN の SVVYGLR を介する細胞接着にはα9 インテグリンを遺伝子導入した SW480 細胞を用いた。トロンビン切断型 OPN がα9 インテグリンと細胞接着するので、本接着試験はトロンビン切断部位までの OPN 構築を作製し、pGEX6P ベクター (Amersham Pharmacia Biotech) に組み込み、GST 部を PreScission protease(Amersham Pharmacia Biotech)で取り除いた OPN(nOPN)を用いた。nOPN を 96 穴プレートに固相し、RGD を介する接着試験と同様な方法で行った。吸光度は 595nm で測定した。

4-2-6. ELISA 法

2K1 と mAb53 のエピトープ探索試験に用いた ELISA 法は次に示す方法で行った。ペプチドは末端にシステイン(Cys)を付加するように合成した。BSA に EMCS を架橋剤として架橋して

おき、合成ペプチド末端の Cys のチオール基と結合させた。BSA を導入した合成ペプチドは 10μg/ml から二倍連続希釈で 50μl を 96 穴プレートに加え、4℃ 一晩放置することによって固相させた。PBS で洗浄後、ブロッキング液 (0.1% BSA/PBS/0.05% NaN3)を加え、4℃ 一晩放置した。精製抗体を 5.0μg/ml となるように希釈液 (0.1% BSA/PBS/0.05% Tween20)で希釈し、50μl/ウェルで添加し、37℃ 30 分反応させた。洗浄液(PBS/0.05% Tween20)で充分にプレートを洗浄後、50μl の 2 ng/ml HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (IBL)を添加し、37℃ 30 分反応させた。洗浄液で充分にプレートを洗浄後、基質液として OPD 溶液を各ウェル中 100μl 添加し、暗所で室温 15 分間放置、停止液 (1N H2SO4)で反応を停止させ、プレートリーダーにて 490 nm の吸光度を測定した。

4-2-7. 細胞遊走試験

U937 細胞を用いた細胞遊走試験は、ChemoTx101-8 システム (Neuroprobe, Gaithersburg,MD)を用いて行った。細胞は 0.1% BSA を含む D-MEM で 2 x 10^6 個/ml に調整し、フィルター(pore size 8 um)の上層に加え、下層には OPN タンパク質を加えた。ChemoTx プレートは 37℃ 5% CO2 下に静置、4 時間後、フィルターをメタノール固定、H-E 染色をした。フィルター裏面まで遊走した細胞数を顕微鏡下（400 倍）で算定し，実験は triplicate で行い、その平均をデータとした。

4-3. 実験結果

4-3-1. モノクローナル抗体による細胞接着阻害効果

OPN1、OPN4、OPN5、OPN6 ペプチドに対する抗 OPN モノクローナル抗体作製を試みた結果、それぞれ 5A1、1B20、2K1、4C1 を樹立した。OPN3 ペプチドについては第 3 章にて 10A16 を樹立している。それぞれの抗原に用いたペプチド部位を図 4-1 に示す。mAb53 を含め計 6 種のモノクローナル抗体が細胞接着阻害能を有するかを調べるために、ヒト線維芽細胞株である TIG-7 細胞を用いた細胞接着試験を行った。(図 4-2)。 6 種のうちの一種 mAb53 はすでに細胞接着阻害作用を有することが報告されているので、この抗体をポジティブコントロールとして使用した。図 4-2A に示すように OPN と TIG-7 との接着は GRGDS ペプチドで阻害され、コント

ロールペプチドでは阻害されないので、RGD 依存性接着である。mAb53 を除く５種の抗体のうち、2K1 のみが細胞接着阻害作用を有することが分かった（図 4-2B)。mAb53 と 2K1 との接着阻害能を調べるために阻害濃度の検討を行った結果、両抗体との同等の阻害能を有することが判明した（図 4-2C)。

4-3-2. 2K1 と mAb53 のエピトープ解析

2K1 と mAb53 は、ともに細胞接着阻害作用を有すが、トロンビン切断型 OPN を 2K1 は検出でき、mAb53 は検出できないという差が存在する。この機能的差異を検討するため、両抗体の詳細なるエピトープ探索試験を行った。その結果、図 4-3 に示すように、2K1 は、SVVYGLR には結合するが、VDTYDGRGDS とは結合しなかった。SVVYGLR との結合は、BSA を C 末に導入した方が、N 末に導入した方より強かった。mAb53 は、2K1 の抗原ペプチドである VDTYDGRGDSVVYGLRS とは結合しなく、VDTYDGRGD とも結合しなかった。SVVYGLR との結合に関しては、2K1 との結合とは逆に、BSA を N 末に導入した方が、C 末に導入した方より強かった。さらに、mAb53 は SVVYGLRSKS と非常に強く結合した。

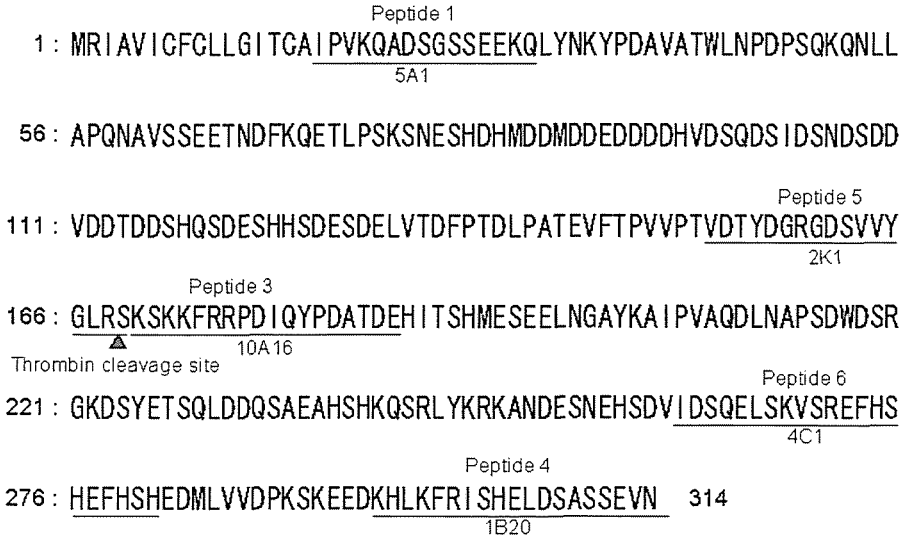


図 4-1. 抗 OPN モノクローナル抗体のペプチド部位と樹立したクローン名
▲はトロンビン切断部位を示している。

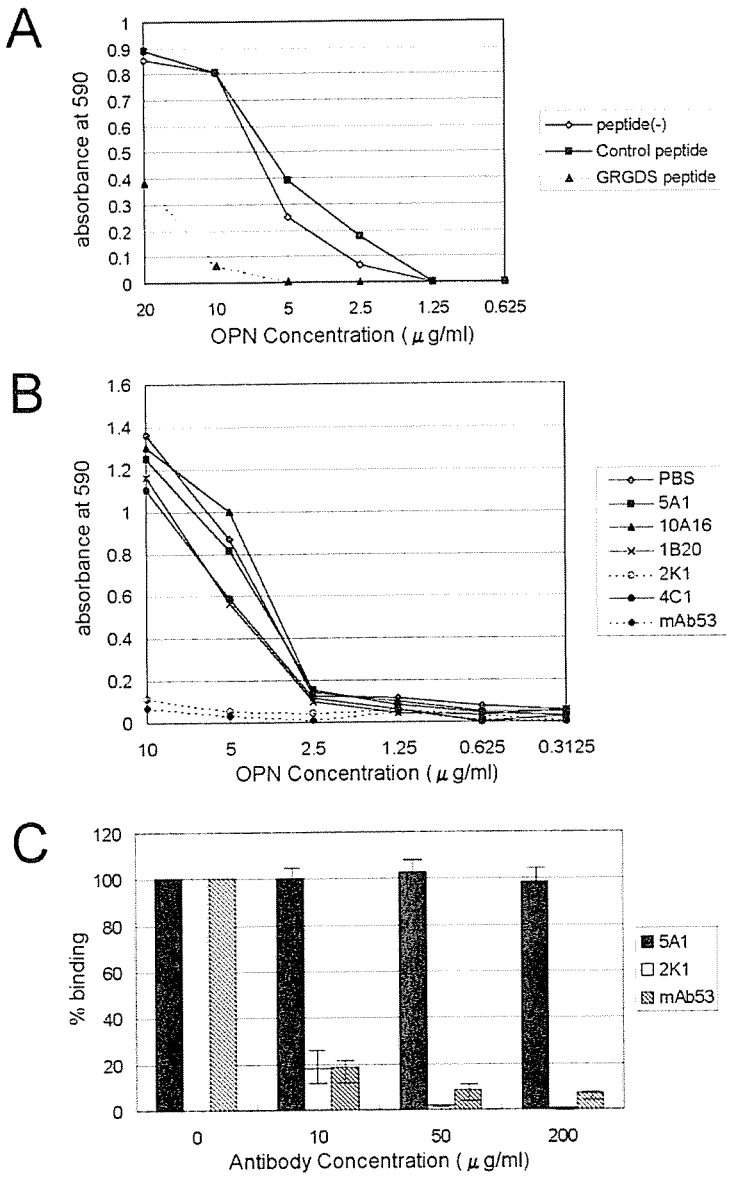


図 4-2. TIG-7 細胞と抗 OPN モノクローナル抗体との細胞接着阻害試験

A. GRGDS ペプチドの阻害効果。B. 抗 OPN モノクローナル抗体の阻害効果。

B. C. 5A1、2K1、mAb53 の阻害濃度試験。

4-3-3. 2K1 のマウス、ラット OPN に対する交差反応性

2K1 は SVVYGLR を認識するが、マウス、ラット OPN は SLAYGLR となっており、配列が異なっている。2K1 が SVVYGLR を認識していれば、マウス、ラット OPN には交差しないは

ずである。そこで、2K1 のマウス、ラット OPN に対する交差反応性を調べるために、CHO 由来マウス、ラット OPN タンパク質を用いたウエスタンブロットを行った（図 4-4)。その結果、2K1 はマウス、ラット OPN に対する交差反応性は見いだせなかった。

4-3-4. α9β1 インテグリンと OPN との接着に対する 2K1 の影響

2K1 は SVVYGLR と結合することを示したが、SVVYGLR 配列はα9β1 インテグリンとの結合配列である。そこで、OPN とα9β1 インテグリンとの接着に対する阻害作用の検討に、α9 遺伝子導入 SW480 細胞を用いて解析を行った。図 4-5A に示すようにビトロネクチンに対するα9 遺伝子導入 SW480 細胞との接着は RGD 依存性である。一方、nOPN に対する接着は、RGD 依存、および非依存性である。RGD 非依存性接着はα9β1 によって介していると考えられたので、α9β1 に対する阻害抗体である Y9A2 を用いて、nOPN とα9 遺伝子導入 SW480 細胞との接着試験を試みたところ、GRGDSP ペプチド存在下で完全に阻害された。この RGD 依存性接着とα9β1 を介する nOPN とα9β1 との接着は 2K1 抗体で阻害することとができ（図 4-5B)、この接着は 5A1 では阻害されなかった。ビトロネクチンとα9 遺伝子導入 SW480 細胞との接着に対しては、5A1、2K1 両抗体とも阻害しなかった。

4-3-5. OPN 誘導細胞遊走に対するモノクローナル抗体の効果

全長、トロンビン切断型、N 末フラグメント OPN は、濃度依存的に U937 細胞を遊走させた（図 4-6A)。2K1 は全長、トロンビン切断型、N 末フラグメント OPN 誘導細胞遊走を阻害した。一方、mAb53 は全長 OPN 誘導細胞遊走のみを阻害した(図 4-6B)。

4-4. 考察

OPN の RGD 依存性の細胞接着を阻害する機能は mAb53 と 2K1 の両抗体に共通して見いだされ（図 4-2)、これらの抗体は GRGDS 近傍、もしくはその配列と機能的に関連している部位を認識していると考えられた。mAb53 はトロンビン切断型 OPN を認識できないことから、トロンビン切断部位と RGD 配列を含むエピトープ、もしくは、機能的、立体構造的に関連している部位を認識していると考えられていた [Bautista et al., 1994]。2K1 は

VDTYDGRGDSVVYGLRS 配列を抗原とした抗ペプチド抗体であり、このペプチドは GRGDS 配列と SVVYGLR という二つの細胞接着部位を含んでいる。図 4-3 に示すように 2K1 は GRGDS 配列には結合しないが、SVVYGLR 配列には有意に結合した。BSA を N 末、または C 末にそれぞれ導入した SVVYGLR 配列との結合性実験で、C 末に BSA を導入した SVVYGLR (SVVYGLR-BSA) の方が N 末に BSA を導入した SVVYGLR (BSA-SVVYGLR)よりも結合力が

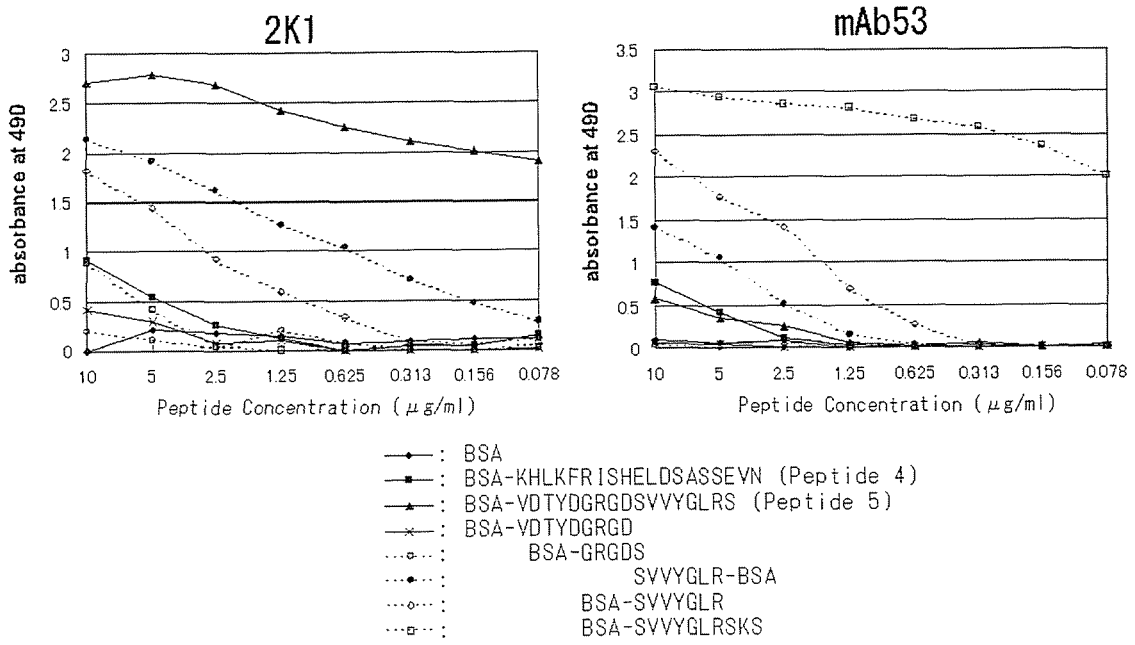


図 4-3. 2K1、mAb53 のエピトープ解析
合成ペプチドを種々の濃度で 96 穴プレートに固相し、抗体濃度は 5.0μg/ml で行い、方法の項目で示したように定量化した。データは 3 回の実験の平均値を示す。

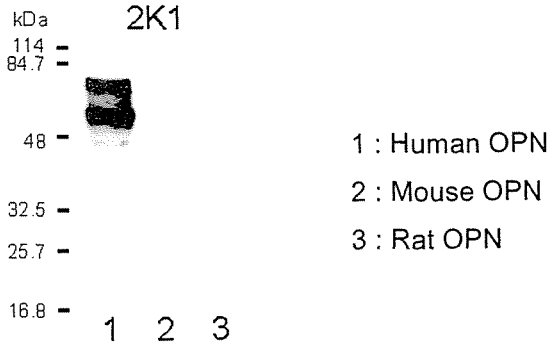


図 4-4 2K1 のラット、マウス OPN に対する交差反応性
ヒト、マウス、ラット OPN は全て CHO 由来精製タンパク質を用いた。2K1 は、マウス、ラット OPN には交差反応を示さなかった。

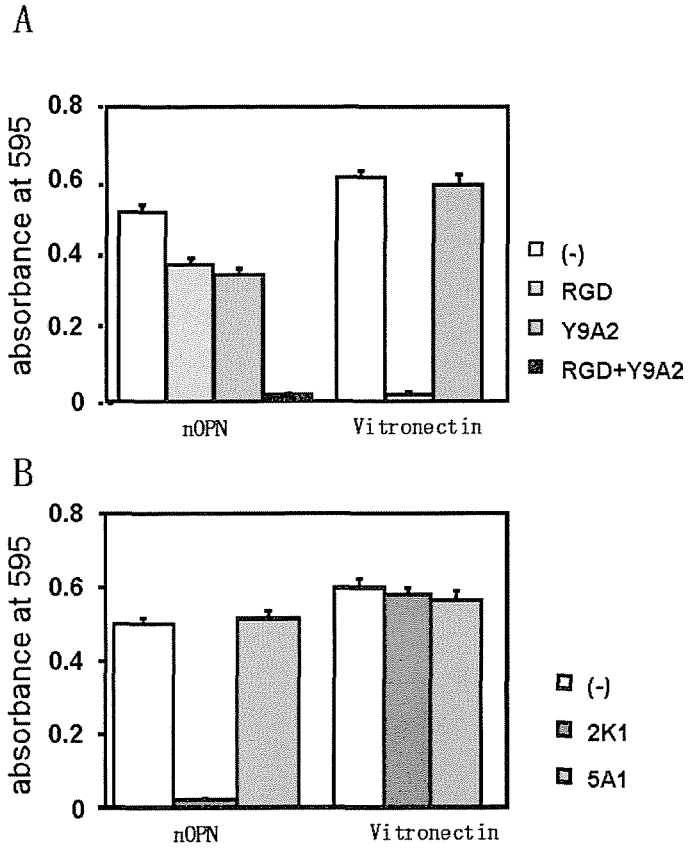


図 4-5. nOPN に対するα9 遺伝子導入 SW480 細胞との RGD 非依存性細胞接着における 2K1 の阻害効果

この実験では、PreScission protease を用いて GST 部を取り除いた N 末フラグメント OPN (nOPN) を用いた。A. ビトロネクチンとα9 遺伝子導入 SW480 細胞との接着は RGD 依存性であるが、nOPN との接着は RGD 依存性、およびα9β1 を介する非依存性接着がある。B. 2K1 は nOPN とα9 遺伝子導入 SW480 細胞との接着に対して阻害効果を示した。

強かった。これは、2K1 が、SVVYGLR 配列の N 末側をより機能的なエピトープとしていることを示唆している。2K1 は、マウス、ラット OPN とは交差反応性を示さないが（図 4-4)、SVVYGLR 配列の N 末側が、ヒト OPN では VV の配列がマウス、ラット OPN では LA となっていることからも、この仮説を裏付けることができる。一方、mAb53 も、SVVYGLR と有意な結合反応を示したが、BSA-SVVYGLR の方が SVVYGLR-BSA よりも結合力は強く、2K1 とは逆の反応性を示した。つまり mAb53 は SVVYGLR の C 末側をエピトープとしていることが示唆された。2K1 のペプチド配列である VDTYDGRGDSVVYGLRS は、同じ配列を含んでいるので、mAb53 との結合活性を調べたところ、結合反応は示さなかった。SVVYGLR の C 末側をエピトープとしていることが示唆されたことから、さらに C 末側にアミノ酸を付加したペプチド

SVVYGLRSKS を合成し、mAb53 との反応性を調べた。その結果、mAb53 はこのペプチドと非常に強い結合活性を示した。SVVYGLRSKS 配列はトロンビン切断部位を含んでおり、Bautista らが推察した、mAb53 がトロンビン切断部位周辺をエピトープとするという仮説を直接的に証明することができた。

2K1 は SVVYGLR 配列を認識するが、SVVYGLR は OPN のトロンビン切断型 N 末フラグメントとα9β1との細胞接着に重要とされる配列である。そこで、リコンビナント N 末フラグメント OPN (nOPN)とα9 遺伝子導入 SW480 細胞との細胞接着に対する 2K1 の阻害効果について検討した（図 4-5)。nOPN とα9 遺伝子導入 SW480 細胞との細胞接着は、RGD を介する接着と、SVVYGLR を介するα9β1との接着がある。図 4-5B に示すように、2K1は nOPN とα9 遺伝子導入 SW480 細胞との細胞接着を完全に阻害した。つまり、2K1 は RGD を介する接着、SVVYGLR とα9β1との接着を両方同時に阻害できる機能を有することが判明した。

2K1 は図 4-6 に示すように、全長型 OPN、トロンビン切断型 OPN、N 末端フラグメントの細胞遊走能を阻害できた。mAb53 は全長型 OPN の細胞遊走能阻害活性を有していたが、トロンビン切断型 OPN、N 末端フラグメントの細胞遊走は阻害できなかった。この結果は mAb53 がトロンビン切断型 OPN と反応性を示さないという報告と一致する[Bautista et al., 1994]。

2K1 は、RGD 依存性細胞接着を阻害し、SVVYGLR 依存性細胞接着であるα9β1 との接着をも阻害でき、さらに、全長型 OPN、トロンビン切断型 OPN の細胞遊走能に対し、阻害活性を持つことが明らかとなった。5A1 と 10A16 は細胞接着、遊走阻害能を有せず、2K1 と mAb53 のエピトープとする配列、すなわち、細胞接着領域である SVVYGLR、トロンビン切断部位を含む GLRSKS 配列が OPN の細胞接着、細胞遊走能における機能部位であることが明らかとなった。

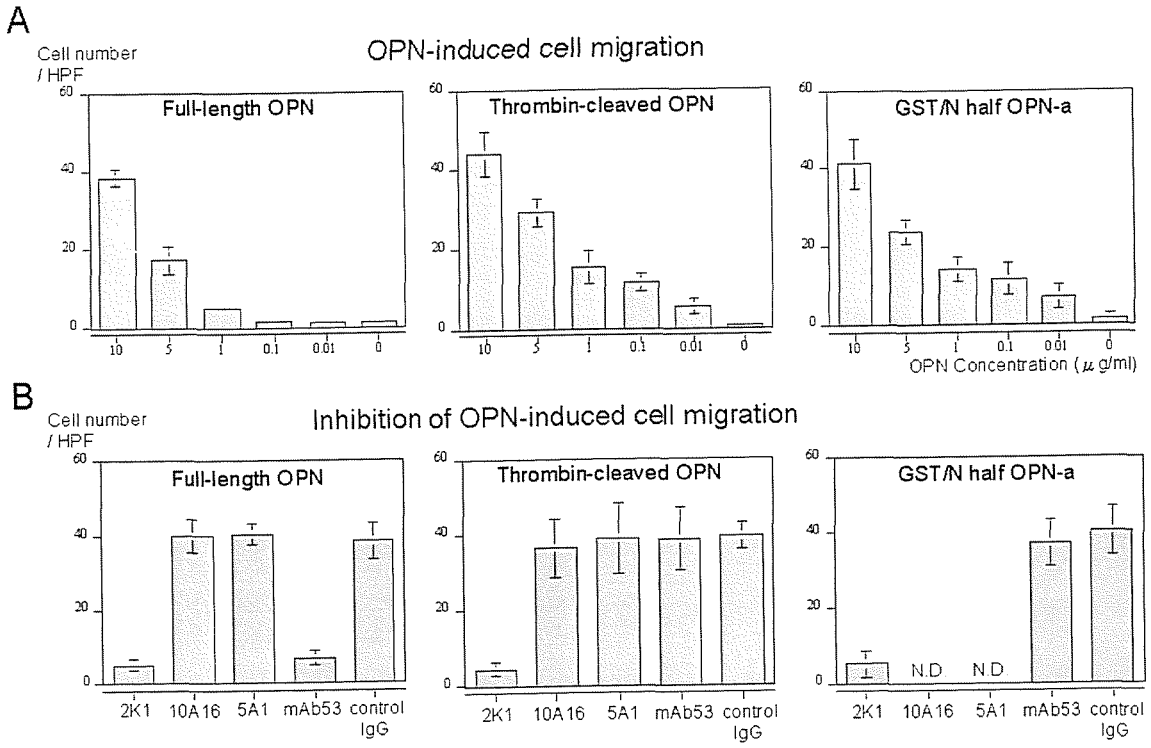


図 4-6. OPN 誘導細胞遊走

A. 全長型 OPN、トロンビン切断型 OPN、N half OPN に対する濃度依存的な U937 細胞の遊走。B. OPN 誘導細胞遊走阻害試験。細胞遊走は 10μg/ml OPN に対して行い、データは抗体を 50μg/ml 加えたときの阻害活性を示している。

第5章　本研究の臨床への応用

5-1.　OPN 測定の臨床的意義

我々は、OPN に対する種々の抗体を作成した。この抗体を用いて OPN の機能、臨床的意義を少しずつ明らかにすることができた。すなわち、10A16 を用いて、ステージ 1 の肺腺癌における組織中 OPN の発現と血管内皮増殖因子(VEGF)発現の関連性を調べた結果、VEGF と OPN が共に陽性の症例は他の群と比較して、局所の血管新生が有意に増加し、予後が不良であることを見いだした[Shijubo et al., 1999; Shijubo et al., 2000]。高グルコース条件下では、血管平滑筋は OPN の発現を増強する。さらに、OPN は血小板由来増殖因子（PDGF）による血管平滑筋細胞の DNA 合成を促進することを見いだし、糖尿病性血管病変における OPN の役割に関して示唆に富む所見を明らかにした[Takemoto et al., 2000]。一方では、ブレオマイシンによる肺線維症モデルマウスにおいて、肺線維症の進行と OPN の発現増強が一致することを、見いだした[Takahashi et al., 2001]。

これまで OPN の存在形態が 1 種類でない事を述べてきた。第 3 章において示した ELISA 系（1-Mono 測定系）を用いて群馬大学の Gang らは、IgA 腎症患者の尿中 OPN は全長型が減少しており、低分子 OPN が発現していることを見いだした [Gang et al., 2001]。

結石患者の尿中には正常では見られないプロテアーゼにより消化された低分子OPNが存在しているという報告がある [Bautista et al., 1996b]。また、転移性乳癌の血漿中 OPN 値は悪性度と一致するという報告があり、さらに腫瘍患者の血中にはトロンビン切断型 OPN が高発現しているという報告もある [Senger et al., 1988]ことから、我々が作成した本測定系を組み合わせて使用することにより、これまで測定不可能な形態の OPN を検出でき、OPN の臨床的意義がより明瞭となると思われる。

5-2.　OPN 機能阻害抗体 2K1 の臨床への応用

2K1 は全長型 OPN による遊走と RGD 依存性細胞接着、トロンビン切断型 OPN による細胞遊走、SVVYGLR を介するα9β1との接着を阻害することができ、OPN 機能阻害抗体ということ

ができる。OPN 欠損マウスでは、Th1 型反応の障害により肉芽腫の形成が低下している [Ashkar et al., 2000]。卵巣摘出によるマウス骨粗鬆症モデルにおいて、野生型マウスと比して OPN 欠損マウスで骨減少の抑制が見いだされている [Yoshitake et al., 1999]。慢性炎症における局所では、トロンビン等のプロテアーゼ活性が上昇していることが予想され、OPN はトロンビン切断型となっている可能性が高い。OPN の SVVYGLR を介する受容体であるα4β1 、α4β7、α9β1 は共に白血球の炎症部位への遊走、活性化の制御に関与しており、α4 を阻害することにより炎症細胞の侵入を抑制し、α9β1 阻害すると好中球の遊走を阻害することから、これらのインテグリンのアンタゴニストは、抗炎症剤となることが示唆されている [Taooka et al., 1999; Alon et al., 1995; Berlin et al., 1995; Bochner et al., 1991; Wahl et al., 1994; Molossi et al., 1995; Shih et al., 1999] 。2K1 は OPN とα9β1 を介する細胞接着を阻害できる。α4β1 とα4β7 を介する 2K1 の接着阻害活性はまだ調べていないが、α4β1 とα4β7 両インテグリンは、α9β1 と同じ OPN 上の SVVYGLR 配列を認識するとされており、2K1 がこれらのインテグリンとの接着を阻害できる可能性は高い。α4β1 に関しては、SVVYGLR 以外にも結合に重要な別の配列があることから、完全には阻害することはできないと思われるが、2K1 は抗炎症剤となりうる可能性がある。すなわち、2K1 は腫瘍、骨粗鬆症、さらにリウマチやサルコイドーシスなどの慢性炎症疾患の治療に用いることができる可能性がある。ちなみに、リウマチ、腫瘍の治療薬として現在、抗αvβ3 抗体(LM609)が抗体医薬として臨床応用されつつある。

第 6 章　今後の研究課題

本論文において、6 種類の ELISA 系を構築している。2-1 系、4-3 系はそれぞれ、トロンビン切断したOPN を測定可能な系であるが、これらの系はトロンビン切断型以外にも全長型OPN も測定してしまう。つまり、全長型とトロンビン切断型 OPN の総量を測定する系である。トロンビン切断された N 末フラグメント OPN は隠れていた細胞接着部位が現れ、新たな受容体と結合するようになる。本研究でも、OPN をトロンビン切断すると、C 末型フラグメントはブロードなバンドが見いだされ、細かく切断されており、一方、N 末側フラグメントは一本のバンドのみが見いだされ、トロンビン切断部位のみが切断されていると考えられ、N 末フラグメントは重要な機能を保持していることが示唆されている。また、トロンビン切断型 OPN は細胞接着力、細胞伸長度が、全長型 OPN より強いという報告があり、これらのことは、トロンビン切断型 OPN のうち N 末フラグメントがより機能的な OPN ということが示唆される。リウマチなどの慢性炎症疾患では、トロンビン切断型 OPN が主に存在していると考えられ、炎症性疾患における発現を正確に調べるためには、トロンビン切断型 OPN を特異的に測定できるような測定系を確立する必要がある。

OPN はトロンビン切断による機能調節の他に、リン酸化による調節も行っている。OPN がマクロファージから IL-12 を産生させるのはリン酸化 OPN 依存性であり、IL-10 を減少させるのはリン酸化 OPN 非依存性である。リン酸化 OPN は血管平滑筋細胞の石灰化の抑制作用を有するが、非リン酸化 OPN はその作用はない。これらの機能的調節を正確に検出するためには、リン酸化 OPN、または脱リン酸化 OPN を特異的に検出できる系が必要である。

本論文で作製した検出系、測定系を用いて、多くの機能と OPN 形態との解析ができると思われるが、上述したトロンビン切断型 OPN を特異的に測定する系、リン酸化 OPN、または脱リン酸化 OPN を特異的に検出できる系を構築することができれば、より効率的に、機能的に OPN 解析ができると思われる。これら系の確立が、OPN 形態を区別可能な実験ツールの作製における残された今後の課題である。

第7章　結語

本研究において、OPN の構造、機能部位を明らかにする目的で、OPN に対する4種のポリクローナル抗体、5種のモノクローナル抗体、6種の ELISA 系を作製し解析を行った。その結果、以下のことを明らかとした。

1) RGD、SVVYGLR 配列を含むペプチドで作製したモノクローナル抗体 2K1 が、全長型 OPN の細胞遊走、RGD 依存性細胞接着、トロンビン切断型 OPN の細胞遊走、SVVYGLR を介するα9β1との細胞接着に対して阻害能を有する。

2) 2K1 は細胞接着領域である SVVYGLR を、mAb53 はトロンビン切断部位を含む GLRSKS を認識しており、これらの領域が OPN の細胞接着、細胞遊走能における機能部位である。

OPN は多くの疾患との関連性が報告されている。腫瘍細胞から分泌される OPN の形態は多様であることを、本研究から明らかとしているが、OPN の多様性と、疾患との関連はほとんど報告されていない。OPN 機能阻害が疾患の治癒につながるという可能性が、腫瘍、骨粗鬆症、慢性炎症で報告されているが、これは、多くの場合が、遺伝子レベルで OPN 発現を低下、または欠損させた結果である。OPN 機能をタンパク質レベルで阻害させるためには、OPN の形態変化に関係なく、阻害する必要がある。本研究で樹立したモノクローナル抗体 2K1 は、全長型、トロンビン切断型 OPN の細胞接着、遊走を阻害することができるため、強力な OPN 機能阻害抗体といえる。慢性炎症にかかわる OPN に対する受容体はα9β1、α4β1、α4β7 と考えられるが、まだ、α9β1以外は 2K1 の阻害能に関しては調べていない。α4β1、α4β7 は OPN との接着に SVVYGLR 配列が重要とされ、α9β1と共通している。そのため、2K1が OPN とこれらのインテグリとの接着を阻害できる可能性は高く、2K1 がα4β1、α4β7 も抑えることができれば、慢性炎症に対して治癒効果が期待でき、抗体医薬となりうる可能性がある。

本研究により、OPN を詳細に検出、測定するための、強力なる実験材料を作製することができた。これらの材料は、直接的に疾患への診断、治癒に結びつく可能性がある。OPN に着目した本研究が医薬への貢献につながることを期待する。

第 8 章　参考文献

Adler B, Ashkar S, Cantor H, Weber GF. (2001) Costimulation by extracellular matrix proteins determines the response to TCR ligation. *Cell Immunol* **210**, 30-40.

Albelda SM, Mette SA, Elder DE, Stewart RM, Damjanovich L, Herlyn M, Buck CA. (1990) Integrin distribution in malignant melanoma: association of the β3 subunit with tumor progression. *Cancer Res* **50**, 6757-6764.

Alon R, Kassner PD, Carr MW, Finger EB, Hemler ME, Springer TA. (1995) The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *J Cell Biol* **128**, 1243-1253.

Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V, Sanchirico ME, Jansson M, Zawaideh S, Rittling SR, Denhardt DT, Glimcher MJ, Cantor H. (2000) Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science* **287**, 860-864.

Atkins K, Berry JE, Zhang WZ, Harris JF, Chambers AF, Simpson RU, Somermann MJ. (1998) Coodinate expression of OPN and associated receptors during monocyte/macrophage differentiation of HL60 cells. *J Cell Physiol.* **175**, 229-239.

Attur MG, Dave MN, Clancy RM, Patel IR, Abramson SB, Amin AR. (2000) Functional genomic analysis in arthritis affected cartilage: yin-yang regulation of inflammatory mediators by integrins. *J Immunol* **164**,2684-2691.

Barry ST, Ludbrook SB, Murrison E, Horgan CMT. (2000) Analysis of α4β1 integrin-osteopontin interaction. *Exp Cell Res* **258**, 342-351.

Bautista DS, Denstedt J, Chambers AF, Harris JF. (1996b) Low-molecular-weight variants of osteopontin generated by serine proteases in urine of patients with kidney stones. *J Cell Biochem* **61**, 402-409.

Bautista DS, Saad Z, Chambers AF, Tonkin KS, O'Malley FP, Singhal H, Tokmakejian S, Bramwell V, Harris JF. (1996a) Quantification of osteopontin in human plasma with an ELISA: Basal levels in pre- and postmenopausal women. *Clin Biochem* **29**, 231-239.

Bautista DS, Xuan JW, Hota C, Chambers AF, Harris JF. (1994) Inhibition of

Arg-Gly-Asp (RGD)-mediated cell adhesion to osteopontin by a monoclonal antibody against osteopontin. *J Biol Chem* **269**, 23280-23285s.

Bayless KJ, Davis GE. (2001) Indentification of dual α4β1 integrin binding sites within a 38 amino acid domain in the N-terminal thrombin fragment of human osteopontin. *J Biol Chem* **276**, 13483-13489.

Behrend EI, Craig AM, Wilson SM, Denhardt DT, Chambers AF. (1994) Reduced malignancy of *ras*-transformed NIH3T3 cells expressing antisense osteopontin RNA. *Cencer Res* **54**, 832-837.

Berlin C, Bargatze RF, Campbell JJ, von Andrian UH, Szabo MC, Hasslen SR, Nelson RD, Berg EL, Erlandsen SL, Butcher EC. (1995) alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell* **80**, 413-422.

Bochner BS, Luscinskas FW, Gimbrone MA Jr, Newman W, Sterbinsky SA, Derse-Anthony CP, Klunk D, Schleimer RP. (1991) Adhesion of human basophils, eosinophils, and neutrophils to interleukin 1-activated human vascular endothelial cells: contributions of endothelial cell adhesion molecules. *J Exp Med* **173**, 1553-1557.

Brown LF, Berse B, Van De Water L, Papadopoulos-Seigiou A, Perruzzi CA, Manseau EJ, Dvorak HF, Senger DR. (1992) Expression and distribution of osteopontin in human tissues: widespread association with luminal epithelial surfaces. *Mol Biol Cell* **3**, 1169-1180.

Brown LF, Papadopoulos-Seigiou A, Brygida B, Manseau EJ, Tognazzi K, Perruzzi CA, Dvorak HF, Senger DR. (1994) Osteopontin expression in human carcinomas. *Am J Pathol* **145**, 610-623.

Carlson I, Tognazzi K, Manseau EJ, Dvorak HF, Brown LF. (1997) Osteopontin is strongly expressed by histiocytes in granulomas of diverse etiology. *Lab Invest* **77**, 103-108.

Chambers AF, Hota C, Prince CW. (1993) Adhesion of metastatic, ras-transformed NIH3T3 cells to osteopontin, fibronectin, and laminin. *Cancer Res* **53**, 701-706.

Crawford HC, Matrisian LM, Liaw L. (1998) Distinct roles of osteopontin in host defense activity and tumor survival during squamous cell carcinoma progression *in Vivo*. *Cancer Res* **58**, 5206-5215.

Denda S, Reichardt LF, Muller U. (1998) Identification of osteopontin as a novel ligand for the integrin alpha8 beta1 and potential roles for this integrin-ligand interaction in kidney morphogenesis. *Mol Biol Cell* **9**, 1425-35.

Denhardt DT, Guo X. (1993) Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J* **7**, 1475-1482.

Dunnington D, Hughes CM, Monaghan P, Rudland PS. (1983) Phenotypic instability of rat mammary epithelial tumor cells. *J Natl Cancer Inst* **71**, 1227-1240.

Flores ME, Norgard M, Heinegard D, Reinholt FP, Andersson G. (1992) RGD-directed attachment of isolated rat osteoclasts to osteopontin, bone sialoprotein, and fibronectin. *Exp Cell Res* **201**, 526-530.

Friedlander M, Brooks PC, Shaffer RW, Kincaid CM, Varner JA, Cheresh D. (1995) Definition of two angiogenic pathways by distinct alfa v integrins. *Science (Washington DC)* **270**, 1500-1502.

Gang X, Ueki K, Kon S, Maeda M, Naruse T, Nojima Y. (2001) Reduced urinary excretion of intact osteopontin in patients with IgA Nephropathy. *Am J Kidney Dis* 37, 374-379.

Gardner HAR, Berse B, Senger DR. (1994) Specific reduction in osteopontin synthesis by antisense RNA inhibits the tumorigenicity of transformed Rat 1 fibroblsts. *Oncogene* **9**, 2321-2326.

Gladson CA, Cheresh DA. (1991) Glioblastoma expression of vitronectin and the αvβ3 integtrin. Adhesion mechanism for transformed glial cells. *J Clin Invest* **88**, 1924-1932.

Gorski JP, Griffin D, Dudley G, Stanford C, Thomas R, Huang C, Lai E, Karr B, Solursh M. (1990) Bone acidic glycoprotein-75 is a major synthetic product of osteoblastic cells and localized as 75- and/or 50-kDa forms in mineralized phases of bone and growth plate and in serum. *J Biol Chem* **265**, 14956-14963.

Green PM, Ludbrook SB, Miller DD, Horgan CMT, Barry ST. (2001) Structural elements of the osteopontin SVVYGLR motif important for the interaction with α4 integrins. *FEBS Lett* **503**, 75-79.

Guo H, Cai CQ, Schroeder RA, Kuo PC. (2001) Osteopontin is a negative feedback

regulator of nitric oxide synthesis in murine macrophages. *J Immunol* **166**, 1079-1086.

Guo X, Zang YP, Mitchell DA, Denhardt DT, Chambers AF. (1995) Identification of a *ras*-activated enhancer in the mouse osteopontin promoter and its interaction with a putative Ets-related transcription factor whose activity correlates with the metastatic potential of the cell. *Mol Cell Biol* **15**, 476-487.

Helluin O, Chan C, Vilaire G, Mousa S, DeGrado WF, Bennett JS. (2000) The activation state of αvβ3 regulates platelet and lymphocyte adhesion to intact and thrombin-cleaved osteopontin. *J Biol Chem* **275**, 18337-18343.

Hu DD, Lin ECK, Kovach NL, Hoyer JR, Smith JW. (1995) A biochemical characterization of the binding of osteopontin to integrins αvβ1 and αvβ5. *J Biol Chem* **270**, 26232-26238.

Hwang SM, Lopez CA, Heck DE, Gardner CR, Laskin DL, Laskin JD, Denhardt DT. (1994) Osteopontin inhibits induction of nitric oxide synthetase gene expression by inflammatory madiaters in mouse kidney epithelial cells. *J Biol Chem* **269**, 711-715.

Iizuka J, Katagiri Y, Tada N, Murakami M, Ikeda T, Sato M, Hirokawa K, Okada S, Hatano M, Tokuhisa T, Uede T. (1998) Introduction of an osteopontin gene confers the increase in B1 cell population and the production of anti-DNA autoantibodies. *Lab Invest* **78**, 1523-1533.

Imai Y, Kakinoki Y, Takizawa N, Nakamura K, Shima H, Kikuchi K. (1999) Up-regulation of nuclear PP1 alfa and PP1 delta in hepatoma cells. *Int J Oncol* **14**, 121-126.

Jono S, Peinado C, Giachelli CM. (2000) Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. *J Biol Chem* **275**, 20197-20203

Katagiri Y, Mori K, Hara T, Tanaka K, Murakami M, Uede T. (1995) Functional analysis of the osteopontin molecule. *Ann NY Acad Sci* **760**, 371-374.

Katagiri Y, Murakami M, Mori K, Iizuka J, Hara T, Tanaka K, Jia WY, Chambers AF, Uede T. (1996) Non-RGD domains of osteopontin promote cell adhesion without involving αv integrins. *J Cell Biochem* **62**, 123-131.

Katagiri YU, Sleeman J, Fujii H, Herrlich P, Hotta H, Tanaka K, Chikuma S, Yagita H,

Okumura K, Murakami M, Saiki I, Chambers AF, Uede T. (1999) CD44 variants but not CD44s cooperate with beta-1 containing integrins to permit cells to bind to osteopontin independently of RGD, thereby stimulating cell motility and chemotaxis. *Cancer Res* **59**, 219-226.

Kinjo M, Oka K, Naito S, Kohga S, Tanaka K, Oboshi S, Hayata Y, Yasumoto K.(1979) Thromboplastic and fibrinolytic activities of cultured human cancer cell lines. *Br J Cancer.* **39**, 15-23.

Komatsubara S. (1978) Establishment of a new cell line (NRC-12) derived from a human renal cell carcinoma and its characteristics. *Nippon Hinyoukika Gakkai Zasshi* **69**, 1535-1452.

Kon S, Maeda M, Segawa T, Hagiwara Y, Horikoshi Y, Chikuma S, Tanaka K, Rashid MM, Inobe M, Chambers AF, Uede T. (2000) Antibodies to different peptides in osteopontin reveal complexities in the various secreted forms. *J Cell Biochem* **77**, 487-498.

Kon S, Yokosaki Y, Maeda M, Segawa T, Horikoshi Y, Tsukagoshi H, Rashid MM, Morimoto J, Inobe M, Shijubo N, Chambers AF, Uede T. (2002) Mapping of functional epitopes of osteopontin by monoclonal antibodies raised against defined internal sequences. *J Cell Biochem*, **84**, 420-432.

Lampe MA, Patarca R, Iregui MV, Cantor H (1991) Polyclonal B cell activation by the Eta-1 cytokine and the development of systemic autoimmune disease. *J Immunol* **147**, 2902-2906.

Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris AL. (1996) Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res* **56**, 4625-4629.

Liaw L, Almeida M, Hart CE, Schwartz SM, Giachelli CM. (1994) Osteopontin promotes vascular cell adhesion and spreading and is chemotactic for smooth muscle cells in vitro. *Circ Res* **74**, 214-224.

Liaw L, Birk DE, Ballas CB, Whitsitt JS, Davidson JM, Hogan LM. (1988) Altered wound healing in mice lacking a functional osteopontin gene (spp1). *J Clin Invest* **101**, 1468-1478.

Liaw L, Skinner MP, Raines EW, Ross R, Cheresh DA, Schwartz SM, Giachelli CM. (1995) The adhesive and migratory effects of osteopontin are mediated via distinct cell surface integrins. Role of αvβ3 in smooth muscle cell migration to osteopontin in vitro. *J Clin Invest* **95**, 713-724.

Liu YK, Uemura T, Nemoto A, Yabe T, Fujii N, Ushida T, Tateishi T. (1997) Osteopontin involvement in integrin-mediated cell signaling and regulation of expression of alkaline phosphatase during early differentiation of UMR cells. *FEBS Lett* **420**, 112-116.

Min W, Shiraga H, Chalko C, Goldfarb S, Krishna GG, Hoyer JR. (1998) Quantitative studies of human urinary excretion of uropontin. *Kidney Int* **53**, 189-193.

Miyauchi A, Alvarez J, Greenfield EM, Teti A, Grano M, Colucci S, Zambonin-Zallone A, Ross FP, Teitelbaum SL, Cheresh D, Hruska KA. (1991) Recognition of osteopontin and related peptides by an alpha v beta 3 integrin stimulates immediate cell signals in osteoclasts. *J Biol Chem* **266**, 20369-20374.

Molossi S, Elices M, Arrhenius T, Diaz R, Coulber C, Rabinovitch M. (1995) Blockade of very late antigen-4 integrin binding to fibronectin with connecting segment-1 peptide reduces accelerated coronary arteriopathy in rabbit cardiac allografts. *J Clin Invest* **95**, 2601-2610.

Mori K, Kobayashi S, Inobe M, Jia WY, Tamakoshi M, Miyazaki T, Uede T. (1994) In vivo cytokine gene expression in various T cell subsets of the autoimmune MRL/Mp-lpr/lpr mouse. *Autoimmunity* **17**, 49-57.

Mori M, Yamaguchi K, Honda S, Nagasaki K, Ueda M, Abe O, Abe K. (1991) Cancer cachexia syndrome developed in nude nice bearing melanoma cells producing leukemia-inhibitory factor. *Cancer Res* **51**, 6656-6659.

Naot D, Sionov RV, Ish-Shalom D. (1997) CD44: structure, function, and association with the malignant process. *Adv Cancer Res* **71**, 241-319.

Nau GJ, Guilfoire P, Chupp GL, Berman JS, Kim SJ, Kornfeld H, Young RA. (1997) A chemoattractant cytokine associated with granulomas in tuberculosis and silicosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94** 6414-6419.

Nemir M, Bhattacharyya D, Li X, Singh K, Mukherjee AB, Mukherjee BB. (2000)

Targeted inhibition of osteopontin expression in the mammary gland cases abnormal morphogenesis and lactation deficiency. *J Biol Chem* **275**, 969-976.

Noda T, Satake M, Yamaguchi Y, Ito Y. (1987) Cooperation of middle and small T antigens of polyomavirus in transformation of established fibroblast and epithelial-like cell lines. *J Virol* **61**, 2253-63.

O'Regan AW, Chupp GL, Lowry JA, Goetschkes M, Mulligan N, Berman JS (1999) Osteopontin is associated with T cells in sarcoid granulomas and has T cell adhesive and cytokine-like properties in vitro. *J Immunol* **162**, 1024-1031.

O'Sullivan C, Lewis CE. (1994) Tumor-associated leukocyte: Friends or foe in breast carcinoma. *J Pathol* **172**, 229-235.

Oates AJ, Barraclough R, Rudland PS. (1996) The identification of osteopontin as a metastasis-associated gene product in a rodent mammary tumor model. *Oncogene* **13**, 97-104.

Ohsawa T. (1989) Age and cell density dependent changes of gangliosides in human diploid fibroblasts. *Exp Gerontol* **24**, 1-9.

Okada Y, Kimura T, Kameoka M, Kishi M, Azuma I, Ikuta K. (1995) Viral activation from latency during retrodifferentiation of U937 cells exposed to phorbol ester followed by infection with human immunodeficiency virus type1. *Immunopharmacology* **30**, 27-39.

Oldberg A, Franzen A, Heinegard D, Pierschbacher M, Ruoslahti E. (1988) Identification of a bone sialoprotein receptor in osteosarcoma cells. *J Biol Chem* **263**, 19433-19436.

Oldberg A, Franzen A, Heinegard D. (1986) Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 8819-23.

Patarca R, Freeman GJ, Singh RP, Wei FY, Durfee T, Blattner F, Regnier DC, Kozak CA, Mock BA, Morse HC, Jerrels TR, Cantor H. (1989) Structural and functional studies of the early T lymphocyte acticvation 1 (Eta-1) gene: definition of a novel T cell-dependent response associated with genetic resistance to bacterial infection. *J Exp Med* **170**, 145-161.

Patarca R, Saavedra RA, Cantor H. (1993) Molecular and cellular basis of genetic resistance to bacterial infection: the role of the early T-lymphocyte acticivation-1/osteopontin gene. *Crit Rev Immunol* **13**, 225-246.

Patarca R, Wei FY, Singh P, Morasso MI, Cantor H. (1990) Dysregulated expression of the T cell cytokine Eta-1 in CD4-8- lymphocytes during the development of murine autoimmune disease. *J Exp Med* **172**, 1177-83.

Rashid MM, Uede T. メラノーマ癌細胞転移における osteopontin と type I コラーゲンの協調作用メラノーマ癌細胞転移における osteopontin と type I コラーゲンの協調作用. in preparation.

Rollo EE, Laskin DL, Denhardt DT. (1996) Osteopontin inhibits nitric oxide production and cytotoxicity by activated RAW264.7 macrophages. *J Leukocyte Biol* **60**, 397-404.

Ross FP, Chappel J, Alvarez JI, Sander D, Butler WT, Farach-Carson MC, Mintz KA, Robey PG, Teitelbaum SL, Cheresh DA. (1993) Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin αvβ3 potentiate bone resorption. *J Biol Chem* **268**, 9901-9907.

Saavedra RA. (1994) The roles of autophosphorylation and phosphorylation in the life of osteopontin. *BioEssays* **16**, 913-918.

Saitoh Y, Kuratsu JI, Takeshima H, Yamamoto S, Ushio Y. (1995) Expression of osteopontin in human glioma. *Lab Invest* **72**, 55-63.

Sefter REB, Sefter EA, Gehlsen KR, Stetler-Stevenson WG, Brown PD, Ruoslahti E, Hendrix MJC. (1992) Role of the αvβ3 integrin in human melanoma cell invasion. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 1557-1561.

Sekiya M, Adachi M, Hinoda Y, Imai K, Yachi A. (1994) Downregulation of Wilms' tumor gene (wt1) during myelomonocytic differentiation in HL60 cells. *Blood* **83**, 1876-1882.

Senger DR, Ledbetter SR, Claffey KP, Papadopoulos-Sergiou A, Perruzzi CA, Detmar M. (1996) Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the αvβ3 integrin, osteopontin, and thrombin. *Am J Pathol* **149**, 293-305.

Senger DR, Perruzzi CA, Gracey CF, Papadopoulos A, Tenen DG. (1988) Secreted

phosphoproteins associated with neoplastic transformation: close homology with plasma proteins cleaved during blood coagulation. *Cancer Res* **48**, 5770-5774.

Senger DR, Perruzzi CA, Papadopoulos A. (1989) Elevated expression of secreted phosphoprotein I (osteopontin, 2ar) as a consequence of neoplasmic transformation. *Anticancer Res* **9**, 1291-1300.

Senger DR, Perruzzi CA, Papadopoulos-Sergiou A, Van De Water L (1994) Adhesive properties of osteopontin: regulation by a naturally occuring thrombin-cleavage in close proximity to the GRGDS cell binding domain. *Mol Biol Cell* **5**, 565-574.

Senger DR, Perruzzi CA. (1996) Cell migration promoted by a potent GRGDS-containing thrombin-cleavage fragment of osteopontin. *Biochim Biophys Acta* **1314**, 13-24.

Shih PT, Brennan ML, Vora DK, Territo MC, Strahl D, Elices MJ, Lusis AJ, Berliner JA. (1999) Blocking very late antigen-4 integrin decreases leukocyte entry and fatty streak formation in mice fed an atherogenic diet. *Circ Res* **84**, 345-351.

Shijubo N, Uede T, Kon S, Maeda M, Segawa T, Imada A, Hirasawa M, Abe S. (1999) Vascular endothelial growth factor and osteopontin in stage I lung adenocarcinoma. *Am J Respir Crit Care Med* **160**, 1269-1273.

Shijubo N, Uede T, Kon S, Nagata M, Abe S. (2000) Vascular endothelial growth factor and osteopontin in tumor biology. *Crit Rev Oncog* **11**, 135-146.

Singh K, Balligand JL, Fischer TA, Smith TW, Kelly RA. (1995) Glucocorticoides increase osteopontin expression in cardiac myocytes and microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* **270**, 28471-28478.

Singh K, Sirokman G, Communal C, Robinson KG, Conrad CH, Brooks WW, Bing OHL, Colucci WS. (1999) Myocardinal osteopontin expression coincides with the development of heart failure. *Hypertension* **33**, 663-670.

Singh RP, Patarca R, Schwartz J, Singh P, Cantor H. (1990) Definition of a specific interaction between early T lymphocyte activation 1 (Eta-1) protein and murine macrophages in vitro and its effects upon macrophages in vivo. *J Exp Med* **171**, 1931-1942.

Singhal H, Bautista DS, Tonkin KS, O'Malley FP, Tuck AB, Chambers AF, Harris JF.

(1997) Elevated plasma osteopontin in metastic breast cancer associated with increased tumor burden and decreased survival. *Clin Cancer Res* 3, 605-611.

Smith LL, Cheung HK, Ling LE, Chen J, Sheppard D, Pytela R, Giachelli CM. (1996) Osteopontin N-terminal domain contains a cryptic adhesive sequence recognized by α9β1 integrin. *J Biol Chem* **271**, 28485-28491.

Smith LL, Greenfield BW, Aruffo A, Giachelli CM. (1999) CD44 is not an adhesive receptor for osteopontin. *J Cell Biochem* **73**, 20-30.

Soldi R, Mitola S, Strasly M, Defilippi P, Tarone G, Bussolino F. (1999) Role of αvβ3 integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *EMBO J* **18**, 882-892.

Sorensen ES, Hojrup P, Petersen TE. (1995) Posttranslational modifications of bovine osteopontin: identification of twenty-eight phosphorylation and three O-glycosylation sites. *Protein Science* **4**, 2040-2049.

Takahashi F, Takahashi K, Maeda K, Tominaga S, Fukuchi Y. (2000) Osteopontin is induced by nitric oxide in RAW264.7 cells. *IUBMB Life* **49**, 217-221.

Takahashi F, Takahashi K, Okazaki T, Maeda K, Ienaga H, Maeda M, Kon S, Uede T, Fukuchi Y. (2001) Role of osteopontin in the pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* **24**, 264-271.

Takemoto M, Yokote K, Nishimura M, Shigematsu T, Hasegawa T, Kon S, Uede T, Matsumoto T, Saito Y, Mori S. (2000) Enhanced expression of osteopontin in human diabetic artery and analysis of its functional role in accelerated atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 624-628.

Taooka Y, Chen J, Yednock T, Sheppard D. (1999) The integrin alpha9beta1 mediates adhesion to activated endothelial cells and transendothelial neutrophil migration through interaction with vascular cell adhesion molecule-1. *J Cell Biol* **145**, 413-420.

Tuck AB, Arsenault DM, O'Malley FP, Hota C, Ling MC, Wilson SM, Chambers AF. (1999) Osteopontin induces increased invasiveness and plasminogen activator expression of human mammary epithelial cells. *Oncogene* **18**, 4237-4246.

Tuck AB, Elliott BE, Hota C, Tremblay E, Chambers AF. (2000) Osteopontin-induced, integrin-dependent migration of human mammary epithelial cells involves activation of

the hepatocyte growth factor receptor (Met). *J Cell Biochem* **78**, 465-475.

Van Dijk S, D'errico JA, Somerman MJ, Farach-carson MC, Butler WT. (1993) Evidence that a non-RGD domain in rat osteopontin is involved in cell attachment. *J Bone Miner Res* **8**, 1499-1506.

Wahl SM, Allen JB, Hines KL, Imamichi T, Wahl AM, Furcht LT, McCarthy JB. (1994) Synthetic fibronectin peptides suppress arthritis in rats by interrupting leukocyte adhesion and recruitment. *J Clin Invest* **94**, 655-662.

Weber GF, Ashkar S, Cantor H. (1997) Interaction between CD44 and osteopontin as a potential basis for metastasis formation. *Proc Assoc Am Physicians* **109**, 1-9.

Weber GF, Ashkar S, Glimcher MJ, Cantor H. (1996) Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science* **271**, 509-512.

Xuan J-W, Hota C, Shigeyama Y, D'Errico JA, Somerman MJ, Chambers AF. (1995) Site-directed mutagenesis of the arginene-glycine-aspartic acid sequence in osteopontin destroys cell adhesion and migratory functions. *J Cell Biochem* **57**, 680-690.

Yamada KM. (1991) Adhesive recognition sequences. *J Biol Chem* **266**, 12809-12812.

Yokosaki Y, Matsuura N, Sasaki T, Murakami I, Schneider H, Higashiyama S, Saitoh Y, Yamakido M, Taooka Y, Sheppard D. (1999) The integrina a9b1 binds to a novel recognition sequence (SVVYGLR) in the thrombin-cleaved amino-terminal fragment of osteopontin. *J Biol Chem* **274**, 36328-36334.

Yokosaki Y, Palmer EL, Prieto AL, Crossin KL, Bourdon MA, Pytela R, Sheppard D. (1994) The integrin alfa9 beta1 mediates cell attachment to a non-RGD site in the third fibronectin type III repeat of tenascin. *J Biol Chem* **269**, 26691-26696.

Yokosaki Y, Sheppard D. (2000) Mapping of the cryptic integrin-binding site in osteopontin suggests a new mechanism by which thrombin can regulate inflammation and tissue repair. *TCM* **10**, 155-159.

Yoshitake H, Rittling SR, Denhardt DT, Noda M. (1999) Osteopontin-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 8156-8160.

第9章　略語表

Ab	; antibody
ADP	; adenosine diphosphate
BSA	; bovine serum albumin
CBB	; coomassie brilliant blue
CD	; cluster of differentiation
CHO	; chinese hamster ovary
DEAE	; diethylaminoethyl
ELISA	; enzyme-linked immunosorbent assay
EMCS	; N-(6-maleimidocaproyloxy)-succinimiode
Eta I	; early T cell activation gene I
FAK	; focal adhesion kinase
FCS	; fetal calf serum
GST	; glutathion S-transferase
HA	; hyaluronic acid
HAT	; hypoxanthine, aminopterin, thymidine
H-E	; hematoxylin-eosin
HPLC	; high-performance liquid choromatography
HRP	; horseradish peroxydase
IFN	; interferon
IL	; interleukin
IPTG	; isopropyl-β-thiogalactopyranoside
Ig	; immunoglobulin
IgA	; immunoglobulin A
IgG	; immunoglobulin G
IgM	; immunoglobulin M
iNOS	; inducible nitric oxide synthase

LPS ; lipopolysaccharide

mAb ; monoclonal antibody

2-Me ; 2-mercaptoethanol

MW ; molecular weight

NO ; nitric oxide

OPD ; o-phenylenediamine

OPN ; osteopontin

PAGE ; polyacrylamide gel electrophoresis

PBS ; phosphate-buffered saline

PCR ; polymerase chain reaction

PDGF ; platelet-derived growth factor

PEG ; polyethylene glycol

PMA ; phorbol 12-myristate 13-acetate

PVDF ; polyvinylidene difluoride

RT ; *Rickettsia tsutsugamushi*

SDS ; sodium dodecylsulfate

SLE ; systemic lupus erythematosus

TMB ; tetramethyl benzidine

Tris ; tris (hydroxymethyl) aminomethane

Tween20 ; polyoxyethylene sorbitan monolaurate

VEGF ; vascular endothelial growth factor

謝辞

本研究を遂行するにあたり、常日頃親身な御討論、御指導をいただき、公私にわたり導き育んで下さいました北海道大学遺伝子病制御研究所分子免疫分野教授、上出利光博士に心より感謝申し上げます。

研究に対しての取り組む姿勢、計画の立て方、考え方、面白さをお教えいただきました元北海道大学遺伝子病制御研究所助手（現、大阪大学大学院医学系研究科病理病態学講座(腫瘍病理学)助手)、村上正晃博士に深く感謝致します。

OPN 研究に際して、OPN の基礎からお教え頂き、精製方法、解析方法など全般にわたり御指導頂きました国立小児医療研究センター病理研究室科学技術振興財団重点研究支援協力員、片桐洋子博士に深く感謝致します。

細胞接着試験全般において多くの御教示を頂き、さらに貴重なデータを提供して頂きました国立療養所広島病院呼吸器科臨床研究室、横崎恭之博士に深く感謝致します。

OPN 研究において多くの御討論、御助言を頂き、さらに貴重なデータを提供して頂きました札幌医科大学医学部第三内科講師、四十坊典晴博士に深く感謝致します。

OPN 研究を支えて下さり、貴重な抗体を提供して頂きました London Regional Cancer Centre 教授、Ann F. Chambers 博士に深く感謝致します。

日々温かい励ましと御助言を頂きました北海道大学遺伝子病制御研究所分子免疫分野助手、猪部学博士に深く感謝致します。

大学院入学以来、有益な御討論、御助言を頂きました北海道大学遺伝子病制御研究所分子免疫分野の皆様に心より感謝致します。

2002 年　3 月