

唾液腺腫瘍における Osteopontin の発現様相に関する研究

加賀井 清

Expression of Osteopontin in Human Salivary Gland Tumors

Kiyoshi Kagai

(平成11年1月19日受付)

緒 言

Franzen と Heinegard は、ウシの骨から2種類の骨シアロタンパク (骨シアロプロテイン I : SP-I, 骨シアロプロテイン II : SP-II) を分離した¹⁾。Ordberg らは、ラット骨肉腫細胞株 (ROS17/2.8) の cDNA ライブラリーから骨シアロタンパク SP-I に対する抗体と反応するタンパクのクローニングを行い、このタンパクをオステオポンチン (OPN) と命名した²⁾。OPN には、骨シアロプロテイン I, 2ar など様々な呼び方があるが、本研究では OPN で統一した。

ヒト OPN は、シグナル配列を持つ314個のアミノ酸残基によって構成される分泌性のリン酸化タンパクで、総アミノ酸の50%以上をグルタミン酸、グルタミン、アスパラギン酸、アスパラギンが占めるという特徴がある³⁻⁵⁾。また、分子の中央部付近には RGD 配列を有し、細胞外基質接着タンパクとして、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ を介した細胞接着や伸展に関与することが知られている^{2,6-8)}。

骨組織の発生・改築過程、あるいは骨折の修復過程において、骨芽細胞や破骨細胞に OPN の発現が認められる⁹⁾。しかし、骨組織だけでなく腎、胎盤、乳腺などの各種の正常組織^{10,11)}、また炎症性細胞¹²⁾ などにも OPN が発現することが知られている。さらに、OPN は細菌感染に対する細胞性免疫に関与するサイトカイン (Eta-1) としても知られ、IgM や IgG の分泌を亢進させることも報告されている¹³⁻¹⁵⁾。このようことから OPN は、多機能タンパクと言われているが、その生理的意義については、未だ未解決の問題が多い。

一方、腫瘍プロモーター12-O-テトラデカノイルホルボール13-アセテート (TPA) による発癌実験によ

り、マウス上皮細胞株 (JB6)¹⁷⁾ から得られた TPA 変異株 (C122) に高発現する 2ar 遺伝子が OPN 遺伝子と同じであることが明らかにされ、OPN は発癌過程にも関与する可能性が示唆されている¹⁶⁻¹⁸⁾。また、癌転移実験系では、高転移株で特異的に OPN mRNA の発現レベルの上昇が認められ¹⁹⁾、アンチセンス OPN mRNA をベクターにより発現させると、OPN 産生低下に伴い転移能が減少したと報告されている²⁰⁻²³⁾。さらに、OPN は血管内皮細胞に発現する CD44 に対しても特異的な結合をすることから^{24,25)}、転移関連遺伝子である可能性も指摘されている。

現在まで、乳癌²⁶⁾、肺癌²⁷⁾をはじめとする、人体の各種臓器の悪性腫瘍および腫瘍周辺の炎症性細胞などに OPN が発現し¹²⁾、癌患者の血清中に OPN が増加する²⁸⁾ などの現象が報告されているが、唾液腺腫瘍における OPN 発現に関する報告はない。そこで本研究では、唾液腺由来の腫瘍組織と培養細胞株における OPN の発現の有無とその意義について検討した。

材料ならびに実験方法

I. 抗体作製

ヒト OPN の 293 - 305 番のアミノ酸配列 (KSKEEDKHLKFRISHE) を含む合成ペプチドを抗原として抗体を作製した (図1)。抗原としたペプチドのアミノ酸配列は、次の3条件を満たす部位から選定した。すなわち、①親水性アミノ酸残基の割合が高く水

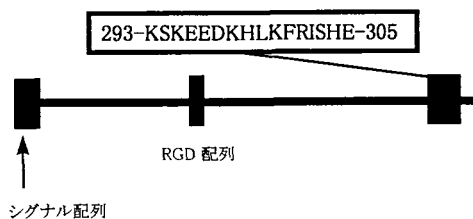


図1 OPN 抗体作製に用いた抗原部位。

広島大学歯学部口腔外科学第二講座 (主任: 石川武憲教授) 本論文の要旨は平成10年4月の第52回日本口腔外科学会総会 (松山市), 平成11年1月第17回日本口腔腫瘍学会総会 (東京都千代田区) において発表した。

溶性と予想される部位, ②合成するペプチド内のアミノ酸配列が, 3つ以上連続してOPNの他の部位の配列と一致しない部位, ③合成するペプチド内のアミノ酸配列が, オステオネクチン, オステオカルシンなどの骨基質に含まれる非コラーゲンタンパクのアミノ酸配列と, 4つ以上連続して一致しない部位を選択した。

ペプチドの合成は, 全自動ペプチド合成装置 (PSSM-8, 島津製作所, 京都) を使用して, Fmoc法により行った。次いで, 82.5%トリフルオロ酢酸, 5%チオアニソール, 5%水, 2.5%エタンジチオールおよび2%チオフェノールの混合液で処理し, 支持体から分離し脱保護した合成ペプチドを, TSK-gel ODS-80Ts カラム (東ソー, 東京) を用いた逆相高速液体クロマトグラフィーにより精製した。精製したペプチドは, 担体である卵アルブミン (Sigma, St. Louis, USA) と3-マレイミドベンゾイン酸N-ヒドロキシスクシニミドエステル (Sigma) を用いて結合後, 初回はフロイントの完全アジュバント (和光純薬, 大阪), 2回目以降はフロイントの不完全アジュバント (和光純薬) とエマルジョンを作製し, ウサギ (日本白色種, 雌, 体重約2kg) の背部皮下に注射した。初回免疫時には, 0.5 ml の生理食塩水に懸濁した百日咳死菌 (和光純薬) を 2×10^9 個大腿部に筋注した。初回免疫から3週間後に2回目の免疫を行い, その後は2週毎に数回の追加免疫をした。少なくとも3回以上の免疫後に採血して血清を分離した。回収した血清を 56°C で30分間処理して補体を非働化した後, アミノセルロファイン (チッソ, 東京) に合成ペプチドを化学結合させたアフィニティーカラムにより抗体精製を行った。抗体の溶出には0.1M グリシン-塩酸 (pH 2.5) を用いた。

抗体の特異性は作製した抗体とそれを抗原ペプチドで吸収した抗体を用い, 次の2つの方法により確認した。①ヒトOPN遺伝子 (OP-10) をヒト胎児腎細胞株 (293T) に導入し, OPN を強制発現させた細胞株 (293T/OP) の培養上清 (大阪大学歯学部生化学講座, 米田俊之教授から供与) を用いたウエスタンブロット法, ②ヒト腎組織 (広島大学医学部病理学第一講座, 田原栄一教授から供与) とヒト胎児骨 (広島大学歯学部口腔解剖学第二講座, 内田隆教授から供与) を用いた免疫組織化学で確認した。

2. 検索材料

in vivo では, 外科的に切除または摘出した正常唾液腺21例 (顎下腺10例, 耳下腺6例, 口蓋腺3例, 口唇腺2例) と, 唾液腺腫瘍47例 (多形性腺腫21例, 粘表皮癌12例, 腺様嚢胞癌14例) を被験対象として用いた。

免疫組織化学のためには, これらの組織を切除・摘出

後, 10%ホルマリンで固定しパラフィンに包埋した。ウエスタンブロットおよびRT-PCRのためには, 切除・摘出後速やかに液体窒素にて凍結し, -40°C で保存した。

in vitro では, 正常唾液腺の初代培養細胞7例 (顎下腺3例, 舌下腺4例), 当科で樹立した腺様嚢胞癌細胞株1例 (KSA²⁹⁾ , および徳島大学歯学部口腔外科学第二講座, 佐藤光信教授より供与された唾液腺由来腺癌細胞株2例 (HSG³⁰⁾ , HSY³¹⁾) を用いた。

3. 細胞培養法

細胞株の培養には, ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM, 日本製薬, 東京) とRPMI1640 (日本製薬) を1:1に調整したRD培地³²⁾ に, ビルビン酸 $110 \mu\text{g}/\text{ml}$ (Sigma), アンピシリン $90 \mu\text{g}/\text{ml}$ (Sigma Co.), 硫酸カナマイシン $90 \mu\text{g}/\text{ml}$ (明治製薬, 東京), 炭酸水素ナトリウム $90 \mu\text{g}/\text{ml}$ (和光純薬), 15 mM HEPES (同仁化学, 熊本) を加え, 最終濃度が10%になるようにウシ胎児血清 (FCS, Boehringer Mannheim, Germany) を添加した培養液を用いた。

正常唾液腺の初代培養には, 前述のRD培地とMCDB153HAA無血清培地³²⁾ を1:9に調整し, $10 \mu\text{M}$ 2-メルカプトエタノール (Sigma), 10 nM 亜セレン酸ナトリウム (Sigma), 10 mM エタノールアミン (Sigma), トランスフェリン (アポ) $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ (Sigma), インスリン $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ (Sigma), ヘパリン (グレードI-A) $10 \text{mg}/\text{ml}$ (Sigma) と牛脳の抽出液約 $2 \mu\text{l}/\text{ml}$ (本学部口腔外科学第一講座, 田中良治博士より供与) を添加した培養液³²⁾ を用いて, 5% CO_2 , 37°C の条件下で9日から16日間静地培養した。また, 一部の唾液腺組織はRD培地で培養後, トリプシン処理して線維芽細胞を含む培養上清を回収し, これを再び静地培養したものを, 唾液腺由来線維芽細胞と見なした。

4. RT-PCR法

Glass MAX RNA Microisolation Spin Cartridge System (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD., USA) を用いて, 培養細胞と組織からtotal RNAを抽出した。total RNAの $1 \mu\text{g}$ をテンプレートとして, First-Strand DNA Synthesis Kit (Pharmacia-LKB, Uppsala, Sweden) を用いて, Mini Cyclor (MJ Research Inc., MA, USA) によりcDNAを合成した。次いで, 合成したDNA溶液4 ml と次のようなOPNに対する特異的なプライマー³³⁾ を用いてPCRを行った。

OP-A (5'-ACCATGAGAATTGCAGTGATTTCG-3')
OP-B (5'-ATTGACCTCAGAAGATGCACACTATC-3')
PCRにはMiniCyclorを用い, 変性 94°C 5分, アニーリング 55°C 2分, 伸長 72°C 3分を1サイクルとして,

2回目以降は変性を2分とし35サイクル行い増幅させた。また、この反応には Ampli Taq Gold (Perkin Elmer, Co., CA, USA) を使用した。

得られた PCR 産物は、1.2%アガロースゲル上で50V、25分電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色後、紫外線照射下で OPN mRNA の発現状態を検索した。なお、陽性コントロールは、ヒト OPN cDNA (NIH, Fisher 博士より供与) を用いた。

5. ウェスタンブロット法

培養細胞と凍結保存した組織は PBS により洗浄後、20 mM HEPES, 150 mM 塩化ナトリウム, 1% トリトン X-100 (片山化学), 10% グリセロール (Sigma), 1.5 mM 塩化マグネシウム (Sigma), 1 mM EGTA (Sigma), アプロチニン 1 μ g/ml (Sigma), ロイペプチン 1 μ g/ml (Sigma), 1 mM ふっ化フェニルメチルスルホニル (PMSF, Sigma) を含む抽出用バッファー (pH 7.5) でホモジネートし、遠心分離して上清を集めた。集めた上清は凍結乾燥し、 -40°C に保存した。

抽出したタンパク 50 μ g を、還元下で 0.1% ラウリル硫酸ナトリウム (SDS) を含む 10% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、ATTO ホライズプロット (ATTO, 東京) を用いて 153 mA, 70 分の条件設定で、ニトロセルロースメンブランフィルター (ADVANTEC, 東京) に転写した。

免疫染色は、Vectastain ABC Elite-Kit (Vector, California, USA) により ABC 法で行った。1次抗体として、本実験で作製した抗 OPN ポリクローナル抗体を 2.5 μ g/ml または 1 μ g/ml の濃度で使用した。ペルオキシダーゼの発色には、Hanker³⁴⁾ の DAB-ニッケル法を用い 3~5 分間反応させた。DAB-ニッケル溶液は 3,3'-ジアミノベンチジン四塩酸塩 (同仁化学) 20 mg, 硫酸ニッケルアンモニウム (片山化学) 300 mg を 0.05M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.6) 100 ml に溶解後、使用前に 30% 過酸化水素水 10 μ l を加えて調整した。以上の操作はすべて室温で行った。

6. 免疫組織化学染色法

切除・摘出した組織を 10% ホルマリン固定、パラフィン包埋したブロックから、4 μ m の薄切切片を作製した。一部の切片は組織観察のためヘマトキシ・エオジン染色およびムチカルミン染色を行った。免疫染色は、Vectastain ABC-AP Rabbit IgG Kit (Vector) により ABC 法で行った。1次抗体として、本実験で作製した抗 OPN ポリクローナル抗体を 1 μ g/ml の濃度で使用した。また発色基質として Vector Red (Vector) を用い、内因性アルカリホスファターゼは Levamisole

Solution (Vector) でブロックした。対比染色にはメチルグリーンを使用した。

免疫染色の評価のために、今回独自に以下の基準を設定した。すなわち、染色標本の 3 視野以上を鏡検し、該当するタイプの細胞 100 個の陽性細胞数の割合を算出して、以下の 3 群に分類した。(一) は陽性細胞が認められなかったもの、(+) は陽性細胞が 1~49% の割合で認められたもの、(++) は免疫反応が 50~100% の割合で認められたものと規定した。

結 果

1. 抗体の特異性に関する検討

ヒト OPN 遺伝子を強制発現させたヒト胎児腎細胞株 (293T/OP) の培養上清を用いてウェスタンブロット解析を行い、米田らの結果 (未発表) と同様に、55 kDa 付近のタンパクが染色された (図 2a)。一方、過剰量の抗原で吸収した抗体 (1 μ g/ml の濃度に希釈した抗体に 10 μ g/ml の抗原ペプチドを加え、 4°C で 1 晩反応させたもの) では、免疫反応は見られなかった (図 2b)。OPN の局在が明らかにされている腎組織と骨組織に対して免疫染色を行い、腎尿細管上皮と骨細胞、骨基質において、過去の報告¹¹⁾ と同様の染色像が観察された (図 3A, 3C)。また、抗原とした合成ペプチドを過剰に加えて吸収した抗体 (1 μ g/ml の濃度に希釈した抗体

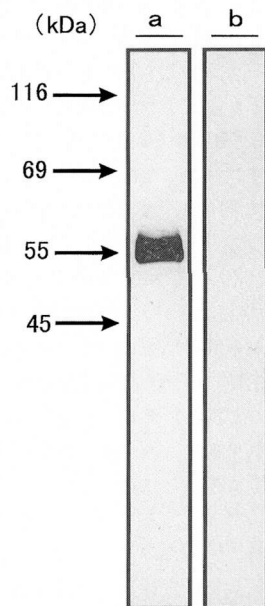


図 2 抗体認識試験。

a: 抗 OPN 抗体使用時, 55 kDa 付近に免疫反応が認められる。

b: 吸収抗体使用時, 免疫反応は認められない。

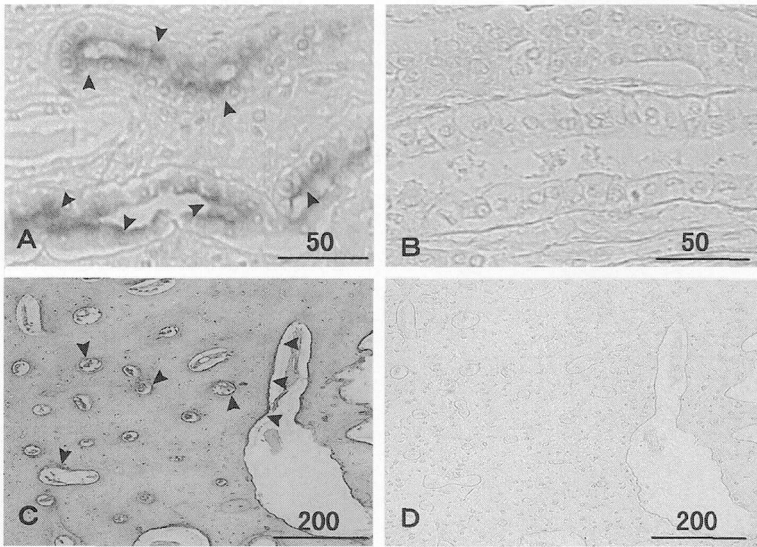


図3 抗体認識試験.

A. ヒト腎尿管上皮細胞 (×300). C. ヒト胎児骨の骨基質の免疫陽性反応 (×80) (矢頭印). 吸収抗体使用時の各対照例 (B, ×325 と D, ×80) には, 免疫反応なし. バーはスケールを表し, 単位は μm である.

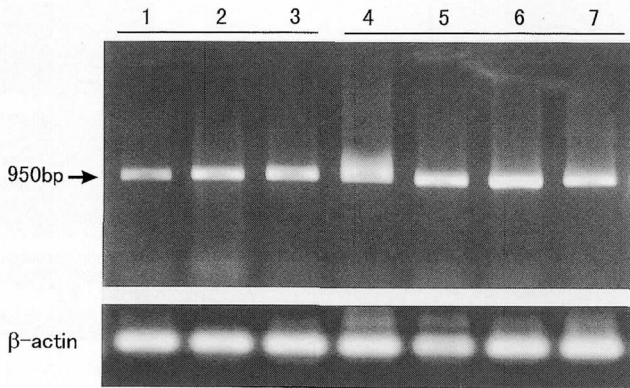


図4 正常唾液腺の初代培養細胞における OPNmRNA の発現.
(1~3: 顎舌腺, 4~7: 舌下腺)

に $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の抗原ペプチドを加え, 4°C で1晩反応させたもの) を用いた場合には, 免疫陽性反応は見られなかった (図 3B, 3D)。以上の結果から, 今回作製した抗体はオステオポンチンを特異的に認識し, ウェスタンブロットと免疫染色に使用できることが判明したため, 本研究では唾液腺組織における OPN の発現に関して, 本抗体を用いて検索することにした。

2. 唾液腺由来培養細胞における OPN の発現

1) OPN mRNA の発現

7例の正常唾液腺初代培養細胞と3種の唾液腺由来癌細胞株の全てで, PCR産物が950 bp 付近に認められた (図 4, 5)。また, 陽性コントロールの OPN

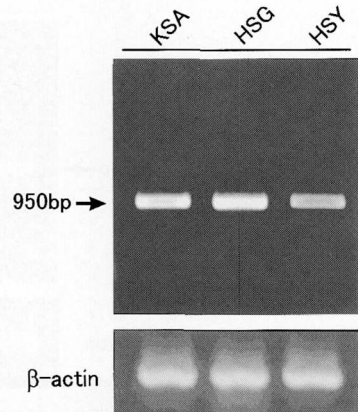


図5 唾液腺由来癌細胞株における OPN mRNA の発現.

cDNA は、950 bp で増幅所見が見られた。

なお、得られたPCR産物は Applied Biosystems (Perkin Elmer, Co., CA, USA) を用いてシーケンスをおこない、ホモロジーサーチによってヒト OPN PCR産物であることを確認した。

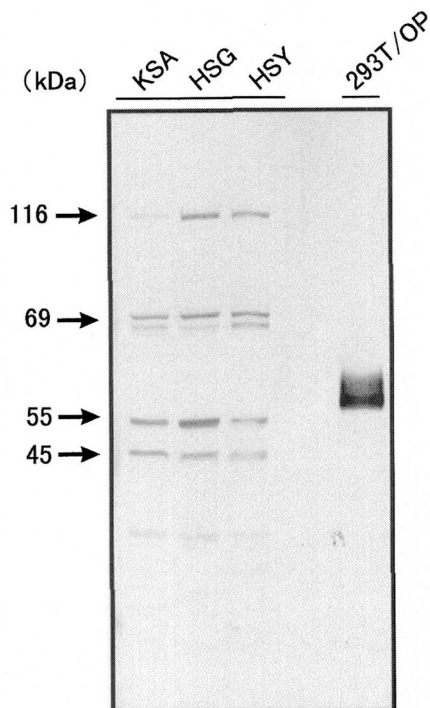


図6 唾液腺癌由来細胞株における OPN 蛋白の発現。
複数のバンドが認められる。
(293T/OP は、陽性コントロール、OP は、
OPN 遺伝子を組み込んだことを意味している。)

2) OPN の発現

3種の唾液腺由来癌細胞株から抽出したタンパクを、還元条件下でウェスタンブロット法で解析した。これらの培養細胞では全例で、69 kDa 付近の分子量が近接した2種類のタンパクと 45 kDa, 50 kDa および 116 kDa 付近のタンパクが明瞭に染色された (図6)。なお、データには示していないが、正常唾液腺培養細胞から抽出したタンパクでは 69 kDa 付近に弱い免疫反応が見られたが、唾液腺由来の培養線維芽細胞から抽出したタンパクには、免疫反応が全く認められなかった。

3. ヒト唾液腺組織における OPN の発現

1) OPN mRNA の発現

検索した全ての正常唾液腺組織と腫瘍組織で、PCR産物が 950 bp 付近に認められた (図7, 8)。

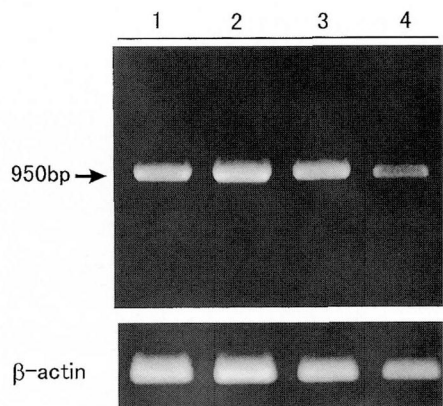


図7 正常唾液組織における OPN mRNA の発現。
(1~4: 顎下腺)

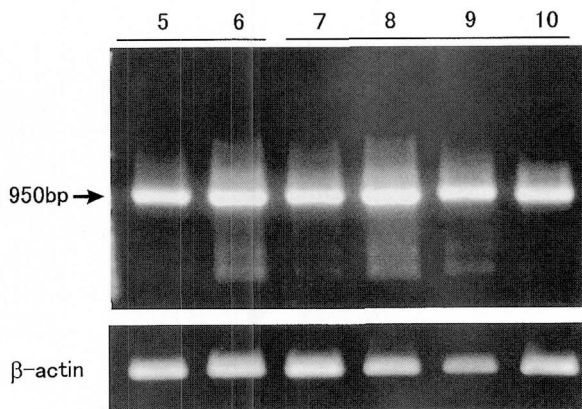


図8 唾液腺腫瘍における OPN mRNA の発現。
(5, 6: 多形性腺腫, 7~10: 粘表皮瘤)

2) OPN の発現

正常唾液腺組織から抽出したタンパクを、還元条件下でウエスタンブロット法で解析した。染色強度に差はあったが、全症例で、45 kDa と 69 kDa 付近のそれぞれ 2 種類のタンパクと、116 kDa 付近のタンパクが染色され、55 kDa 付近にも弱い免疫反応が認められた (図 9)。

唾液腺腫瘍組織では、腫瘍の組織型の違いに関わらず、正常組織と同様の位置に泳動される複数のタンパクが検出されたが、55 kDa 付近のタンパクは正常組織より強く反応した。また、正常組織とは異なり、40 kDa 付近にも明瞭な陽性反応が検出された (図 10)。

3) OPN の局在

正常唾液腺では、程度の差はあったが、粘液性細胞を除く各種の唾液腺上皮細胞は OPN 陽性を示した。導管形成細胞は常に強陽性を示したが、漿液性細胞は各症例により、また同一切片上でも部位により、陽性細胞率が異なっていた (図 11A, 表 1)。筋上皮細胞の染色性は腺房細胞周囲で判定したが、漿液性細胞と同様に症例や部位によって染色性は異なり、陽性と陰性の細胞が共に見られた (図 11B, 表 1)。

多形性腺腫では、腺腔裏装細胞や扁平上皮化生細胞で OPN 強陽性であったが (図 11C, 11F, 表 2)、腺腔外層部細胞や充実性増殖部の細胞の多くは陰性を示

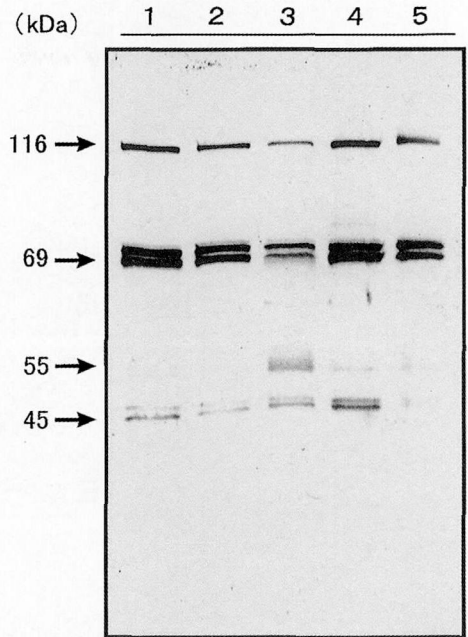


図 9 正常唾液腺組織における OPN 蛋白の発現。
複数のバンドが発現した。
(1～5：顎下腺)

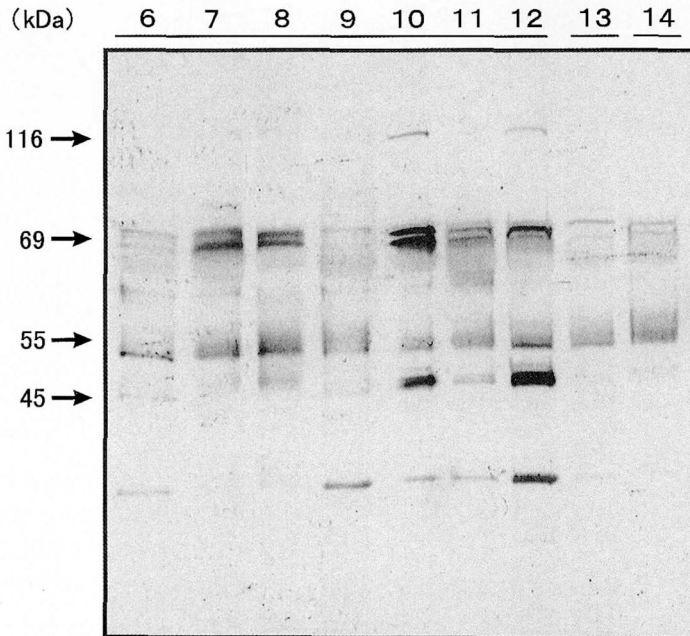


図 10 唾液腺腫瘍組織における OPN 蛋白の発現。
複数のバンドが発現。
(6～12：多形性腺腫, 13：腺様嚢胞案, 14：粘表皮瘤)

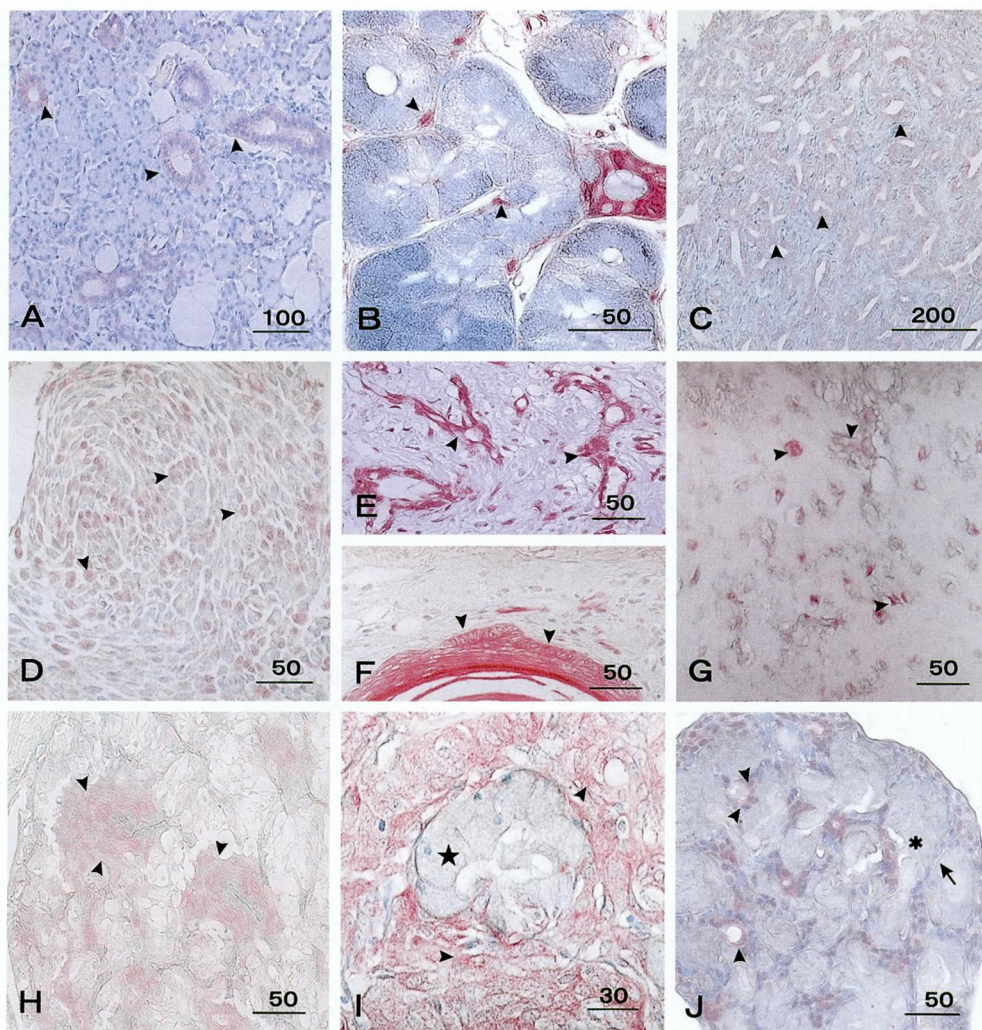


図11 唾液腺組織における OPN の免疫組織像。

A：正常唾液腺では、導管を形成している腺上皮細胞に陽性所見（矢頭印×100）。B：粘液性細胞は陰性、腺房周囲の筋上皮細胞と思われる細胞には陽性例あり（×300）、C：多形性腺腫では、腺腔裏装細胞部が陽性（×80）、D：充実性増殖細胞部（×200）、E：索状細胞部（×175）、F：扁平上皮化性細胞部（×175）、G：軟骨様細胞部（×175）の全てに陽性所見が認められた。H：粘表皮癌の類表皮細胞部（矢頭×175）で陽性所見を認めたが、I：★の粘液産性細胞部では陰性であった（×350）。J：腺様嚢胞癌では、矢頭で示す腺腔裏装細胞で陽性、また*で示す偽嚢胞裏装細胞では発現が弱かった。

Jの矢印は、偽嚢胞裏装細胞での陰性所見例（×200）。

バーはスケールを表し、単位は μm である。

した（図 11C, 11E, 表 2）。しかし、粘液腫様部と軟骨様部の細胞は、腺腔外層部や充実性部の細胞に比べて、OPN 陽性率が高かった（図 11E, 11G, 表 2）。

粘表皮癌では、殆どの類表皮細胞が OPN 陽性を示したのに対し、ムチカルミン染色陽性の粘液産生細胞は陰性を示した（図 11H, 11I, 表 3）。また、中間細胞の OPN 陽性率は、上記 2 種類の細胞の中間の値を示した（表 3）。

腺様嚢胞癌における染色結果は、多形性腺腫と同様の傾向を示した。すなわち、腺腔裏装細胞は OPN 強陽性を示したのに対して、腺腔部外層、偽嚢胞裏装部、充実性増殖部の細胞の OPN 陽性率は低値を呈した（図 11J, 表 4）。

表1 正常唾液腺細胞における OPN の発現

分類	導管細胞	漿液性細胞	粘液性細胞	筋上皮細胞
顎下腺 n=10	++ 10 (100%) + 0 (0%) - 0 (0%)	0 (0%) 2 (20%) 8 (0%)	0 (0%) 0 (0%) 10 (100%)	+ , -
耳下腺 n=6	++ 4 (80%) + 2 (20%) - 0 (0%)	0 (0%) 2 (33%) 4 (67%)	/	不明
口蓋腺 n=3	++ 3 (100%) + 0 (0%) - 0 (0%)	/	0 (0%) 0 (0%) 3 (100%)	不明
口唇腺 n=2	++ 2 (100%) + 0 (0%) - 0 (0%)	0 (0%) 2 (100%) 0 (0%)	0 (0%) 0 (0%) 2 (100%)	不明

++ : 50~100%の陽性細胞, + : 1~49%の陽性細胞, - : 陽性細胞が認められない。

表2 多形成腺腫の構成細胞における OPN の発現結果

分類	腺腔裏装細胞 n=18	腺腔部外層細胞 n=18	充実性増殖部細胞 n=19	扁平上皮化生部細胞 n=8	索状部細胞 n=4	粘液腫様部細胞 n=13	軟骨様部細胞 n=7
++	18 (100%)	6 (33%)	4 (21%)	8 (100%)	4 (100%)	6 (46%)	3 (43%)
+	0 (0%)	12 (67%)	12 (63%)	0 (0%)	0 (0%)	7 (54%)	3 (43%)
-	0 (0%)	0 (0%)	3 (16%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (14%)

++ : 50~100%の陽性細胞, + : 1~49%の陽性細胞, - : 陽性細胞が認められない。

表3 粘表皮癌の構成細胞における OPN の発現

分類	中間細胞 n=9	粘液産生細胞 n=12	類表皮様細胞 n=12
++	3 (33%)	0 (0%)	12 (100%)
+	6 (67%)	0 (0%)	0 (0%)
-	0 (0%)	12 (100%)	0 (0%)

++ : 50~100%の陽性細胞, + : 1~49%の陽性細胞, - : 陽性細胞が認められない。

表4 腺様嚢胞癌における構成細胞における OPN の発現

分類	腺腔裏装細胞 n=12	腺腔部外層細胞 n=12	偽嚢胞裏装細胞 n=8	充実性増殖部細胞 n=7
++	12 (100%)	6 (50%)	1 (12.5%)	2 (20%)
+	0 (0%)	6 (50%)	6 (62.5%)	7 (70%)
-	0 (0%)	0 (0%)	2 (25%)	1 (10%)

++ : 50~100%の陽性細胞, + : 1~49%の陽性細胞, - : 陽性細胞が認められない。

考 察

1. 抗体作製について

遺伝子レベルでの解析により、タンパク質のアミノ酸配列を知ることが可能な現在、この情報をもとに抗体を作製することは容易となった。抗体作製法には、リコンビナントタンパクを抗原とする方法と合成ペプチドを抗原として抗体を作製する方法がある。抗原として合成ペプチドを用いた場合には、作製した抗体が必ずしも目的のタンパクと特異的な反応をするとは限らない反面、抗原の作製は容易で抗体の認識する部位も明瞭であるという利点がある。本研究では、C末端側の合成ペプチドを抗原として抗体を作製したが、本抗体と他の部位を抗原とする抗体、例えば、N末端側を抗原とした抗体などを組み合わせることにより、今後 OPN 分解産物の局在や分解様式についても明らかにできる可能性がある。一方、リコンビナントタンパクを抗原として用いた場合には、合成ペプチドに比べて、目的とするタンパクの抗体を効率よく作製できる利点はあるが、認識部位の不明瞭なことが欠点とな

る。以上のことを総合的に考えて、本研究では合成ペプチドを抗原として抗体を作製した。

今回作製した抗 OPN 抗体について、精製した OPN に対する認識テストは行っていない。しかし、ヒト腎やヒト胎児骨の免疫組織化学では従来の報告^{3-6, 10, 11)}と同様の部位が染色され、この染色は吸収試験で消失した。また、OPN 遺伝子を強制発現させた培養細胞の培養上清では、米田らの結果（未発表）と同様に、55 kDa 付近のタンパク反応した。以上の結果、本抗体は OPN を特異的に認識していると考えられた。

2. OPN の分子量

SDS ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動で調べたヒト OPN の分子量については様々な報告がある。Fisher らはヒト頭蓋冠から OPN（骨シアロプロテイン I）を精製し、その分子量がウシ骨の OPN（70~80 kDa）と同様であったと述べている³⁵⁾。Senger らはヒトの乳汁に含まれる OPN の分子量は約 75 kDa であったと報告している³⁶⁾。Brown らのヒト胆汁のウエスタンブロットによると、約 75 kDa の他に低分子及び高分子成分が抗 OPN 抗体と反応した¹¹⁾。Senger と Perruzzi はヒト腫瘍の培養細胞株は分子量 66 kDa から 69 kDa の OPN を分泌することを見出した³⁷⁾。Saitoh らは、ヒト・グリオーマ細胞における OPN は、53 kDa, 47 kDa および 38 kDa タンパクとして発現することを報告している³³⁾。

本研究では唾液腺組織および唾液腺由来培養細胞株での、ウエスタンブロット解析で、45 kDa, 55 kDa, 69 kDa および 116 kDa 付近のタンパクが染色された。これらのうち 116 kDa 以外のタンパクは過去の報告と類似した分子量を持っていた^{11, 33, 35-37)}。Fisher らによれば、301 アミノ酸残基よりなるヒト OPN コアタンパクの計算上の分子量は 33.352 kDa である⁶⁾。ヒト OPN には、N-結合型の糖鎖が付加される可能性があるアミノ酸配列（アスパラギン-X-セリン残基）を 2 カ所含むが、これらのアスパラギン残基への糖鎖の結合については、O 結合型の糖鎖の付加や、セリン残基、スレオニン残基のリン酸化と同様報告はない。しかし、ラット³⁸⁾ やウシ³⁹⁾ の OPN と同様に、ヒト OPN も糖鎖が付加されリン酸化されており、これにより OPN の分子量はコアタンパクの分子量より大きくなると考えられる。一般的に、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分子量はあまり正確ではなく、さらに OPN は強く陰性に荷電しているため、泳動に使用したゲルの濃度や架橋度の違いにより、分子量が変動することが知られている^{5, 40)}。以上のことから、ヒト唾液腺及び唾液腺由来培養細胞株では、45 kDa 付近のタンパクが OPN

のコアタンパクに相当し、55 kDa および 69 kDa 付近のタンパクは、糖鎖の付加とリン酸化により修飾を受けた分泌型タンパクと考えられる。

ヒト OPN mRNA には同一遺伝子からの択一的スプライシングによる 42 塩基の欠落が知られている⁴⁾。これは 14 アミノ酸残基に相当し、分子量では約 2 kDa にあたる。本研究では、抗 OPN 抗体と反応した 45 kDa 付近のタンパクは 2 本の近接したバンドに分かれており、これは OPN mRNA の択一的スプライシングによるものと考えられた。一方、69 kDa 付近のタンパクも近接した 2 本のバンドに分けられるが、この 2 本のバンドの分子量の差は 2 kDa より大きく、mRNA の択一的スプライシングに加え、糖鎖の付加やリン酸化の違いにより分子量に差が生じたと考えられる。

本研究では、55 kDa タンパクの免疫反応は正常唾液腺組織よりも腫瘍組織やその培養細胞株に強く、また OPN 遺伝子を組み込んで強制発現させた細胞株では、55 kDa タンパクのみが染色された。OPN の糖鎖の付加やリン酸化には動物種差ばかりでなく、組織依存性があると考えられている⁵⁾。ラット骨から抽出した OPN は、N-結合型の糖鎖が 1 カ所、O 結合型の糖鎖が 5~6 カ所付加され、13 のリン酸基が結合している³⁸⁾。ウシ乳腺の OPN は N-結合型の糖鎖が付加される可能性を持つアミノ酸配列（アスパラギン-X-セリン残基）を 3 カ所含むが、いずれの部位にも糖鎖は付加されない。しかし、3 カ所のスレオニン残基に O 結合型の糖鎖が付加され、28 のリン酸基が結合している³⁹⁾。さらに、Ashker ら^{41, 42)} は大腸菌で作ったリコンビナント OPN がカゼインキナーゼ II とサイクリック AMP 依存性プロテインキナーゼの基質となり、自己リン酸化を起こしうることを明らかにしている。従って、55 kDa タンパクと 69 kDa 蛋白質の発現程度が腫瘍細胞と正常細胞で異なっていたことは、OPN コアタンパクの修飾が腫瘍細胞と正常唾液腺細胞で異なっていることを示していると考えられる。

3. 正常唾液腺における OPN の発現

Brown らは正常唾液腺組織を免疫組織化学で調べ、導管上皮細胞と粘液性細胞が限局性に OPN 陽性を示したと報告している¹¹⁾。しかし、漿液性細胞や筋上皮細胞については触れていない。

本研究の免疫組織化学では、検索した正常唾液腺組織の全ての症例で導管上皮細胞が抗 OPN 抗体と反応し、そのうち 90% の症例では、50% 以上の導管上皮細胞に OPN の発現が認められた。また、顎下腺の 20%、耳下腺では 33% の症例で OPN 陽性の漿液性細胞が認められ、筋上皮細胞も陽性反応を示した。さらに RT-PCR

によって正常唾液腺組織における OPN mRNA の発現を確認した。従って、正常唾液腺において、これらの細胞が OPN を発現していることはほぼ確実と考えられる。

一方、Brown らの報告とは異なり、本研究では検索した21症例の総てにおいて、粘液性細胞に OPN の発現は認められなかった¹¹⁾。Brown らの論文には対象とした唾液腺の種類や症例数に関する記載はなく、また非特異反応の出やすい間接法を用い、一次抗体の濃度も 10 $\mu\text{g/ml}$ とやや高い¹¹⁾。一方、本研究では4種類の唾液腺（合計21症例）について、間接法よりも感度が高く非特異反応の起こり難い ABC 法⁴³⁾ を用いて免疫染色し、抗体の濃度も 1 $\mu\text{g/ml}$ であった。従って、Brown らが報告した粘液性細胞の染色は、非特異反応であった可能性も考えられ、粘液性細胞における OPN の発現については、in situ hybridization 法による検討が必要である。

漿液性細胞は各症例により、また同一切片上でも部位により、陽性細胞率が異なっていた。OPN の産生調節には、各種ホルモン⁴⁴⁻⁴⁶⁾、増殖因子^{17, 18)}、サイトカイン¹³⁻¹⁵⁾ 等の多数の因子が関与している。Craig らは、妊娠、授乳期のマウスの子宮などで、OPN の著しい上昇がみられ、女性ホルモンによる OPN 産生調整の可能性を示唆している¹⁰⁾。また、ビタミン D-欠乏食で飼育したマウスでは、腎臓での OPN の発現が有意に減少し、活性型ビタミン D 投与により正常レベルに戻ることが報告している⁴⁷⁾。従って、唾液腺においてもこれら様々な因子により OPN の発現が調節され、その結果漿液性細胞の染色性に差が生じた可能性がある。また、分泌性タンパクである OPN の細胞内の量は、腺房細胞の分泌活性に影響を受けて変動する可能性も否定できない。

4. 唾液腺腫瘍とその株化細胞における OPN の発現

Senger らは³²⁾ P のオートラジオグラフを用いて分泌性のリン酸化タンパクが腫瘍マーカーとなりうる可能性を示し、後にこのリン酸化タンパクは OPN であることが明らかとなった^{37, 48, 49)}。Brown らは、ノーザンブロット法、in situ hybridization 法、免疫組織化学法により、ヒト腫瘍組織における OPN の発現を検索した¹²⁾。その結果、免疫組織化学では結腸癌、肺癌等の腫瘍細胞とマクロファージがともに抗 OPN 抗体と反応したが、in situ hybridization では、OPN mRNA の発現はマクロファージにのみ認められ、腫瘍細胞には認められなかったことを報告している。この結果から、彼らはマクロファージによって分泌された OPN がインテグリン $\alpha_v\beta_3$ を介して腫瘍細胞に結合した可能性を示唆して

いる。しかし、彼らは腎癌および子宮内膜の癌腫では、腫瘍細胞質内にも OPN mRNA 陽性反応が認められ、癌細胞自身とマクロファージが共に、OPN を発現していることを報告している¹²⁾。

本研究では、検索した唾液腺腫瘍の総てについて、程度の差はあるものの OPN 陽性の腫瘍細胞が認められた。また、他の腫瘍組織での報告とは異なり、組織中の炎症性細胞には OPN の強発現は観察されず、マクロファージが分泌した OPN がインテグリン $\alpha_v\beta_3$ を介して唾液腺腫瘍細胞に結合した可能性は低く、腫瘍細胞自身が OPN を発現していたと考えられる。

唾液腺腫瘍での OPN の発現は、腺上皮系細胞に強発現したが、筋上皮系細胞での発現程度は弱かった。但し、同じ筋上皮系細胞でも細胞型や間葉細胞との混在度により、OPN の発現程度に差がみられた。唾液腺株化細胞をプラスチックシャーレ上で培養した場合、コラーゲンでシャーレーを処理することによって OPN の産生が減少したことから、細胞外基質の有無や量により OPN の産生が調節される可能性が示唆されている（石川、加賀井ら未発表）。従って、in vivo においても細胞外基質の有無や量により、OPN の産生量が変化した可能性が考えられる。

5. 唾液腺腫瘍の悪性度と OPN の発現

Bellahcene らは、免疫組織化学法を用いて乳癌における OPN の発現状態を調べ、正常乳腺組織では21例中17例（81%）、良性腫瘍では28例中17例（60.9%）で OPN の発現は弱い、あるいは認められなかったのに対し、悪性腫瘍では25例中22例で OPN の強発現が認められ、癌の悪性度と OPN が相関を示したと報告している²⁶⁾。Saitoh らは、免疫組織化学法とノーザンブロット法によってヒトのグリオーマの OPN 発現を調べ、悪性度が高いほど OPN の発現が高かったことを示した³³⁾。また Ue らは、ノーザンブロット法によって胃腺癌の OPN mRNA の発現を検索し、胃腺癌原発腫瘍40例中29例（72.5%）、リンパ節転移5例中3例（60%）で、正常胃粘膜に対し OPN mRNA の増加が認められることを明らかにした。さらに腫瘍部における OPN mRNA の発現レベルは、低分化型腺癌に比べ高分化型腺癌で高く、臨床病期の進行と共に増加する傾向があること示し、胃腺癌での OPN の過剰発現が癌の増殖・進展に関与する可能性を示唆している⁵⁰⁾。

一方 Tiniakos らは、免疫組織化学法、ウエスタンブロット法、in situ hybridization 法で卵巣癌とその転移30症例における OPN の発現を調べ、腫瘍の組織型、悪性度や転移との関係はなかったと報告している。しかも、OPN のどの様な作用が発癌や腫瘍の悪性化、転移

と関係するのは、殆ど判っていない⁵¹⁾。

本研究では唾液腺の正常と腫瘍、また培養細胞と組織の如何に関わらず OPN mRNA が発現し、その発現レベルに明らかな差は認められなかった。また免疫組織化学では、良性・悪性腫瘍共に発現しており、唾液腺腫瘍の悪性度との関連性を示唆することはできなかった。しかし、その発現率は構成細胞のタイプ別に異なっていたことから、むしろ細胞分化と関連している可能性が推定された。

結 論

唾液腺組織と唾液腺由来培養細胞における OPN の発現様相について、新たに作製した抗ヒト OPN ポリクローナル抗体を用いた免疫組織化学と RT-PCR によって検討し、以下の結果を得た。

(1) 検索した全ての唾液腺由来正常培養細胞と唾液腺腫瘍細胞株には、OPN と OPN mRNA の発現が認められた。

(2) 検索した全ての正常唾液腺、良性と悪性唾液腺腫瘍組織には OPN と OPN mRNA の発現が認められた。

(3) 正常と腫瘍の唾液腺組織では、導管上皮系細胞での OPN の発現は強かった。また、正常唾液腺の粘性細胞と粘表皮癌の粘液産生細胞では、OPN の発現は認められなかった。

以上の結果、唾液腺組織における OPN の発現様相は、腫瘍の悪性度とはあまり関係がなく、むしろ細胞分化と強く関連している可能性が示唆された。

謝 辞

本研究に際して、終始懇篤なる御指導を賜りました広島大学歯学部口腔外科学第二講座石川武憲教授に心から感謝の意を表します。また、本研究を進めるに際し、御教示、御校閲を賜りました本学口腔生化学講座加藤幸夫教授、本学口腔解剖学第二講座内田隆教授に深甚なる謝意を表します。さらに本研究の遂行および論文作成に当たり、御指導と御助言を賜った、広島大学歯学部附属病院臨床検査室小川都子講師、本学歯学部口腔解剖学第二講座村上千景先生、ならびに本学歯学部口腔外科学第二講座杉山勝助教授に謹んで御礼申し上げます。また、御支援を頂きました本学歯学部口腔外科学第二講座の諸先生方に感謝いたします。

最後に、常に私を支えてくれた両親、兄、友人に感謝いたします。

参 考 文 献

1) Franzen, A. and Heinegard, D.: Isolation and

characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. *Biochem. J.* **232**(3), 715-724, 1985.

- 2) Oldberg, A., Franzen, A. and Heinegard, D.: Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell binding sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **8**, 8819-8823, 1986.
- 3) Kiefer, M.C., Bauer, D.M. and Barr, P.J.: The cDNA and derived amino acid sequence for human osteopontin. *Nucleic Acids Res.* **17**(8), 3306, 1989.
- 4) Young, M.F., Kerr, J.M., Termine, J.D., Wewer, U.M., Wang, M.G. and McBride, O.W.: cDNA cloning, and mRNA distribution and heterogeneity, chromosomal location, and RFLP analysis of human osteopontin (OPN). *Genomics*, **7**, 491-502 1990.
- 5) Denhardt, D.T. and Guo, X.: osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J.* **7**, 1475-1482, 1993.
- 6) Fisher, W. Larry, Wesley McBride, O. Termine, John D. and Young, M.K.: Human bone sialoprotein. *J. Biol. Chem.*, **256**(4), 2347-2351, 1990.
- 7) Ross, F.P., Chappel, J., Alvarez, J.I., Sander, D., Butler, W.T., Franch-Carson, M.C., Mintz, K.A., Robey, P.G., Teitelbaum, S.L. and Cheresch, D.A.: Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin alpha V beta 3 potentiate bone resorption. *J. Biol. Chem.*, **268**, 9901-9907, 1993.
- 8) Chambers, A.F., Charulata, H. and Prince, C.W.: Adhesion of metastatic, ras-transformed NIH3T3 cells to osteopontin, fibronectin, and laminin. *Cancer Res.*, **53**, 701-706, 1993.
- 9) 野村慎太郎, 佐藤宗彦, 寺井邦博, 川畑浩久, 杉本瑞生: オステオポンチンからうかがう骨組織。細胞工学, 秀潤社 **3**, 349-356, 1998.
- 10) Craig, A.M. and Denhardt, D.T.: The murine gene encoding secreted phosphoprotein 1 (osteopontin): promoter structure, activity, and induction in vivo by estrogen and progesterone. *Gene*. **100**, 163-171, 1991.
- 11) Brown, L.F., Livingston, B. Berse., Van De Water, Ageliki Papadopoulos-Sergiou, Carole A. Perruzzi, Eleanor J. Manseau, Harold F. Dvorak and Senger, D.R.: Expression and Distribution of Osteopontin in Human Tissues: Widespread Association with Luminal Epithelial Surfaces. *Mol. Biol. Cell.*, **3**, 1169-1180, 1992.
- 12) Brown, L.F., Berse, B., Papadopoulos-Sergiou, A., Perruzzi, C.A., Dvorak, H.F., Manseau, E.J. and Senger, D.R.: Osteopontin Expression and distribution in human Carcinomas. *Am. J. Pathol.*, **145**(3), 610-623, 1994.

- 13) Patarca, R., Freeman, G.J., Singh, R.P., Wei, F.-Y., Durfee, T., Blattner, F., Regnier, D.C., Kozak, C.A., Mock, B.A., Morse III, H.C., Jerrells, T.R. and Cantor, H.: Structural and functional studies of the early T lymphocyte activation 1 (Eta-1) gene. *J. Exp. Med.* **170**, 145–161, 1989.
- 14) Jin, C.H., Miyaura, C., Ishimi, Y., Hong, M.H., Sato, T., Abe, E. and Suda, T.: Interleukin 1 regulates the expression of osteopontin mRNA by osteoblasts. *Mol. Cell. Endocr.* **74**, 221–228, 1990.
- 15) Lampe, M.A., Patarca, R., Iregui, M.V. and Canter, H.: B cell activation by the Eta-1 cytokine and the development of systemic autoimmune disease. *J. Immunol.* **147**, 2902–2906, 1991.
- 16) Cring, A.M., Nemir, M., Mukherjee, B.B., Chambers, A.F. and Denhardt, D.T.: Identification of the major phosphoprotein secreted by many rodent cell lines as 2ar/osteopontin: Expression in H-ras-transformed 3T3 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **158**(1), 166–173, 1986.
- 17) Smith, J.H. and Denhardt, D.T.: Molecular cloning of a tumor promoter-inducible mRNA found in JB6 mouse epidermal cells: induction is stable at high, but at low, cell densities. *J. Cell Biochem.* **34**, 13–22, 1987.
- 18) Craig, A.M., James, H. Smith and Denhardt, D.T.: Osteopontin, a transformation-associated cell adhesion phosphoprotein, is induced by 12-o-tetradecanoylphorbol 13-acetate in mouse epidermis. *J. Biol. Chem.*, **264**, 9682–9689, 1989.
- 19) Chambers, A.F., Charulata, H. and Prince, C.W.: Adhesion of metastatic, ras-transformed NIH3T3 cells to osteopontin, fibronectin, and laminin. *Cancer Res.*, **53**, 701–706, 1993.
- 20) Craig, A.M., Bowden, G.T. and Chambers, A.F.: Secreted phosphoprotein mRNA is induced during multi-stage carcinogenesis in mouse skin and correlates with the metastatic potential of murine fibroblasts. *Int. J. Cancer.* **46**, 133–137, 1990.
- 21) Behrend, E.I., Craig, A.M., Wilson, S.M., Denhardt, D.T. and Chambers, A.F.: Reduced malignancy of ras transformed NIH3T3 cells expressing antisense osteopontin RNA. *Cancer Res.*, **54**, 832–837, 1994.
- 22) Gardner, H.A., Berse, B. and Senger, D.R.: Specific reduction in osteopontin synthesis by antisense RNA inhibits the tumorigenicity of transformed rat 1 fibroblasts. *Oncogene* **9**, 2321–2326, 1994.
- 23) Longcheng, S., Mukherjee, A.B. and Mukherjee, B.B.: Expression of antisense osteopontin RNA inhibits tumor promoter-induced neoplastic transformation of mouse JB6 epidermal cell. *Oncogene*, **10**, 2163–2169, 1995.
- 24) Arch, R., Wirth, K., Hofmann, M., Ponta, H., Matzku, S., Herrlich, P. and Zoller, M.: Participation in normal immune responses of a metastasis-inducing splice variant of CD44. *Science.*, **257**, 682–685, 1992.
- 25) Weber, G.F., Ashkar, S., Glimcher, M.J. and Cantor, H.: Receptor-ligand interaction between CD44 and Osteopontin (Eta-1). *Science*, **271**, 509–512, 1996.
- 26) Bellahcene, A. and Castronovo, V.: Increased Expression of osteonecetin and osteopontin, two bone matrix proteins, in human breast cancer. *Am. J. Pathol.* **146**, 95–100, 1995.
- 27) Chambers, A.F., Wilson S.M., Kerkvliet N, O'Malley, F.P., Harris, J.F. and Casson, A.G.: Osteopontin expression in lung cancer. *Lung. Cancer*, **15**(3), 311–323, 1996.
- 28) Senger, D.R., Ferruzzi, C.A., Gracey, F.C., Papadopoulos, A. and Tenen. D.G.: Secreted phosphoproteins associated with neoplastic transformation: close homology with plasma proteins cleaved during blood coagulation. *Cancer Res.*, **48**, 5770–5774, 1988.
- 29) kemoto, K., Murakami, K., Yasui, A., Ishikawa, T. and Shimosato T.: Biological properties of newly-established cell line (KSA) from human adenoid cystic carcinoma of salivary gland origin. *Tissue Culture in Dentistry* **26**, 41–43, 1989.
- 30) Shirasuna, K., Sato, M. and Miyazaki, T.: Aneoplastic Epithelial Duct Cell Line Established from an Irradiated Human Salivary Gland. *Cancer* **48**, 745–752, 1981.
- 31) Yasunaga, T., Hayashi, Y., Nagamine, S., Yoshida, H., Yura, Y. and Sato, M.: Generation of cells with phenotypes of both intercalated duct-type and myoepithelial cells in human parotid gland adenocarcinoma clonals cells grown in athmic nude mice. *Virchows Archiv B* **51**, 187–195, 1986.
- 32) 尾崎輝彦, 岡本哲治, 藪本正文, 明見能成, 高田和彰: 口腔由来正常細胞および口腔癌細胞の無血清培養下での増殖に及ぼす EGF, FGF の影響ならびにこれらの細胞における受容体解析. 口腔外科学雑誌. Aug., 1454–1465, 1991.
- 33) Saitoh, Y., Kuratsu, J., Takakeshita, H., Yamamoto, S. and Ushio, Y.: Expression of osteopontin in human glioma. *Lab Invest.*, **72**, 55–63, 1995.
- 34) Hanker, J.S., Amehrose, W.W., James, C.J., Mandelkorn, J., Yates, P. E., Gall, S.A., Bossen, E.H., Fay J.W., Laszlo, J. and Moore, J.O.: Facilitaed light microscopic cytochemical diagnosis of acute myelogenous leukemia. *Cancer Res.*, **39**, 1635–1639, 1979.
- 35) Fisher, L.W., Hawkins, G.R., Tuross, N. and Termine, J.D.: Purification and partial characterization of small proteoglycans I and II, bone sialoproteins I and II, and osteopontin from the

- mineral compartment of developing human bone. *J. Biol. Chem.*, **262**(20), 9702–9708, 1987.
- 36) Senger, D.R., Perruzzi, C.A., Papadopoulos, A. and Tenen, D.G.: Purification of human milk protein closely similar to tumor-secreted phosphoproteins and osteopontin. *Biochim. Biophys. Acta*, **996**, 43–48, 1989.
 - 37) Senger, D.R. and Perruzzi, C.A.: Secreted phosphoprotein markers for neoplastic transformation of human epithelial and fibroblastic cells. *Cancer Res.*, **45**, 5818–5823, 1985.
 - 38) Prince, C.W., Oosawa, T., Butler, W.T., Tomana, M., Bhowm, A.S., Bhowm, M. and Schrohenloher, R.E.: Isolation, characterization, and biosynthesis of a phosphorylated glycoprotein from rat bone. *J. Biol. Chem.*, **262**(6), 2900–2907, 1987.
 - 39) Sorensen, E.S., Hojrup, P. and Petersen, T.E.: Posttranslation modifications of bovine osteopontin: identification of twenty-eight phosphorylation and three O-glycosylation sites. *Protein Sci.*, **4**(10), 2040–2049, 1995.
 - 40) Kubota, T., Zhang, Qi, Wrana, J.L., Ber, Rebecca, Aubin, J.E., Butler, William T. and Jaro Sodek: Multiple forms of spp I (secreted phosphoprotein, osteopontin) synthesized by normal and transformed rat bone cell populations: regulation TGF- β . *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **162**(3), 1453–1459, 1989.
 - 41) Ashker, S., Teplow, D.B., Glimcher, M.J. and saavedra, R.A.: In vitro phosphorylation of mouse osteopontin expressed in *E. coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **191**(1), 126–133, 1993.
 - 42) Ashker, S., Glimcher, M.J. and saavedra, R.A.: Mouse osteopontin expressed in *E. coli* exhibits autophosphorylating activity of tyrosine residues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **194**(1), 274–279, 1993.
 - 43) Hsu, S.M., Cossman, J. and Jaffe, E.S.: A comparison of ABC, unlabeled antibody and conjugated immunohistochemical methods with monoclonal and polyclonal antibodies — an examination of germinal center of tonsils. *Am. J. Clin. Pathol.*, **80**(4), 429–435, 1983.
 - 44) Yoon, K., Buenaga, R. and Rodan, G.A.: Tissue specificity and developmental expression of rat osteopontin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **148**, 1129–1136, 1987.
 - 45) Noda, M. and Rodan, G.A.: Transcriptional regulation of osteopontin in rat osteoblast-like cells by parathyroid hormone. *J. Cell Biol.* **108**, 713–718, 1988.
 - 46) Jin, C.H., Miyaura, C., Ishimi, Y., Hong, M.H., Sato, T., Abe, E. and Suda, T.: Interleukin 1 regulates the expression of osteopontin mRNA by osteoblasts. *Mol. Cell. Endocr.* **74**, 221–228, 1990.
 - 47) Jin, C.H., Shinki, T., Hong, M.H., Sato, T., Yamaguti, A., Ikeda, T., Yoshiki, S., Abe, E. and Suda, T.: 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 regulates in vivo production of the third component of complement (C3) in bone. *Endocrinology*, **131**, 2468–2475, 1992.
 - 48) Senger, D.R., Wirth, D.F. and Hynees, R.O.: Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins. *Cell*, **16**(4), 885–893, 1979.
 - 49) Senger, D.R., Perruzzi, C.A. and Papadopoulos, A.: Elevated expression of secreted phosphoprotein I (osteopontin, 2ar) as a consequence of neoplastic transformation. *Anticancer Res.*, **9**(5), 1291–1299, 1989.
 - 50) Ue, T., Yokozaki, H., Kitadai, Y., Yamamoto, S., Yasui, W., Ishikawa, T. and Tahara, E.: Co-Expression of Osteopontin and CD44 in Gastric Cancer. *Int. J. Cancer*. **79**, 127–132, 1998.
 - 51) Tiniakos, D.G., Yu, H. and Liapis, H.: Osteopontin expression in ovarian carcinomas and tumors of low malignant potential (LMP). *Hum. Pathol.*, **29**(11), 1250–1254, 1998.