

REVIEW ARTICLE

オステオポンチンは悪性胸膜中皮腫の細胞機能に影響を与える

大橋里奈^{1,2}・田島 健^{1,2}・崔 日^{1,2}・顧 涛^{1,2}・樋野興夫³・
塩見 和⁴・宮元秀昭⁵・西尾和人⁶・高橋和久^{1,2}

Osteopontin Modulates Malignant Pleural Mesothelioma Cell Functions
in Vitro

Rina Ohashi^{1,2}; Ken Tajima^{1,2}; Ri Cui^{1,2}; Tao Gu^{1,2}; Okio Hino³;
Kazu Shiomi⁴; Hideaki Miyamoto⁵; Kazuto Nishio⁶; Kazuhisa Takahashi^{1,2}

¹Department of Respiratory Medicine, ²Research Institute for Disease of Old Ages, ³Department of Pathology and Oncology,
⁴Department of General Thoracic Surgery, Juntendo University, School of Medicine, Japan; ⁵Department of General Thoracic
Surgery, Minami-Tohoku Hospital, Japan; ⁶Department of Genome Biology, Kinki University School of Medicine, Japan.

ABSTRACT — **Objective.** It has been reported that serum osteopontin (OPN) levels of persons with exposure to asbestos who have malignant pleural mesothelioma (MPM) are increasing and useful for early diagnosis of MPM. OPN contains binding sites for several receptors including $\alpha v \beta 3$ integrins, which are thought to play various roles in mediating cell-matrix interactions. The aim of this study is to evaluate roles of OPN in MPM cell line. **Methods.** With MPM cell lines, we conducted reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) to evaluate OPN mRNA expression. Expression of integrins on the surface of this cell line were analyzed with a FACScanTM. To evaluate cell adhesion and proliferation mediated by OPN, cells were added to 96-well flat bottom plates coated with OPN, bovine serum albumin (BSA), poly-L-lysine (PLL) or hyaluronate (HA). Adherent and viable cells were counted with cell counting kit-8TM. To evaluate phosphorylation of focal adhesion kinase (FAK) in H28 cells on OPN, we performed immunoprecipitation and immunoblotting. Apoptotic cells cultured on these plates were detected by the binding of annexin V. **Results.** OPN and $\alpha v \beta 3$ expression was detected with both RT-PCR and FACScanTM, respectively. H28 cells adhered to OPN, PLL, or HA to much greater extent than to BSA. However, H28 cells cultured on OPN coated plates showed enhanced proliferation, but not on BSA, PLL or HA. In addition, high level of phosphorylated FAK in H28 cells plated on OPN was observed. Furthermore, less apoptotic cells were revealed cultured on OPN coated plates in comparison to others. **Conclusion.** In conclusion, OPN may play an important role in the enhancement of adhesion and proliferation of H28 cells, presumably by interacting with $\alpha v \beta 3$ integrins.

(JLCC. 2009;49:368-375)

KEY WORDS — Malignant pleural mesothelioma, Osteopontin, $\alpha v \beta 3$ integrin

Reprints: Rina Ohashi, Department of Respiratory Medicine, Juntendo University, School of Medicine, 2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8421, Japan (e-mail: rinaoahas@juntendo.ac.jp).

要旨 — **目的.** オステオポンチン (OPN) はインテグリン $\alpha v \beta 3$ を介して癌の進展や血管新生などに関与する接着分子であり、アスベストに曝露された悪性胸膜中皮腫患者の血清マーカーとして有用であることが報告された。本研究では悪性胸膜中皮腫細胞株における OPN の

発現、接着、増殖、アポトーシスにおける役割について検討する。**方法.** 各種の中皮腫細胞株を用い OPN の発現、細胞表面上の各種インテグリンの発現を評価した。固相化した OPN と細胞株との接着、増殖試験を抗 $\alpha v \beta 3$ 抗体もしくは Arginine-Glycine-Aspartic acid (RGD) ペ

順天堂大学 ¹呼吸器内科, ²老人性疾患病態・治療研究センター, ³病理腫瘍学, ⁴呼吸器外科; ⁵南東北病院呼吸器外科; ⁶近畿大学医学部ゲノム生物学講座。

別刷請求先: 大橋里奈, 順天堂大学呼吸器内科, 〒113-8421 東

京都文京区本郷 2-1-1 (e-mail: rinaoahas@juntendo.ac.jp).

※第 48 回日本肺癌学会総会シンポジウム「悪性中皮腫の克服に向けて」。

プチドの添加・非添加の条件下で行った。同様に OPN 上でのアポトーシスと遊走能の評価と固相化 OPN 上における focal adhesion kinase (FAK) のリン酸化を検討した。結果、Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) の結果、肉腫型胸膜中皮腫細胞株で OPN の発現を認めた。同様に FACSscan™ では αv と $\beta 3$ の発現と OPN に対しての接着、増殖の増強を認めたが、抗 $\alpha v \beta 3$ 抗体もしくは RGD ペプチドの添加により阻害

された。また OPN 上で抗アポトーシス作用と、FAK のリン酸化の増強が認められた。結論、肉腫型中皮腫細胞株において OPN に対する接着、増殖の増強、抗アポトーシス、FAK のリン酸化の増強が認められた。この機序にインテグリン $\alpha v \beta 3$ を介するシグナルが寄与している可能性が示唆された。

索引用語—— 悪性胸膜中皮腫、オステオポンチン、 $\alpha v \beta 3$ インテグリン

はじめに

悪性胸膜中皮腫は体腔内面を覆う漿膜に発生し、局所的に浸潤・進行する予後不良の悪性腫瘍である。^{1,2} 近年の新規抗癌剤の登場にも関わらず、進行悪性胸膜中皮腫の予後は上皮型中皮腫患者で平均 10~17 ヶ月、肉腫型に至っては 4~7 ヶ月といまだ芳しくない。³

中皮腫細胞は細胞外マトリックス (extracellular matrix: ECM) 分子と接触後、インテグリンを介して細胞外リガンドと結合することにより腫瘍の転移、浸潤に関与している。また中皮腫細胞はヒアルロン酸、ファイブロネクチン、テネイシンなどの ECM を産生し、接着・遊走・播種を生じていると報告されている。^{4,8}

一方、2005 年に Pass らはアスベストに曝露した胸膜中皮腫患者において ECM 分子のひとつであるオステオポンチン (osteopontin: OPN) の血清中濃度が上昇し、早期診断に有用であると報告している。⁹ 同様に胸膜中皮腫患者の胸水において OPN 濃度が高い傾向にある。¹⁰ OPN は活性化マクロファージなどから産生分泌されるリン酸化糖蛋白で細胞接着や遊走、一酸化窒素合成酵素

(iNOS) の抑制などの機能を有する多機能分子である。¹¹⁻¹³ 分子構造のほぼ中央部に細胞接着配列のアルギニン、グリシン、アスパラギン酸の RGD ドメインを有し、 $\alpha v \beta 3$ などのインテグリンと結合することで機能発現する。¹⁴⁻¹⁶ そのほか悪性細胞への形質転換、癌転移、感染防御などに関与することが報告されている。^{12,17}

しかしながら、悪性胸膜中皮腫細胞における OPN の役割については明らかでない。われわれは悪性胸膜中皮腫細胞株における OPN の発現、接着、増殖、アポトーシス、遊走における役割について検討した。

材料と方法

免疫組織化学染色

免疫組織化学染色は avidin-biotin complex (ABC) 法にて行い、一時抗体は市販されている OPN エピトープ特異ラビット抗体 (Spring-BioScience, Fremont, CA: 希釈率 50 倍にて使用) を使用した。

使用細胞株

肉腫型: H28, 上皮型: H2452, 二相性: MSTO-211H, 中皮細胞: Met5A を用いた (American Type Culture

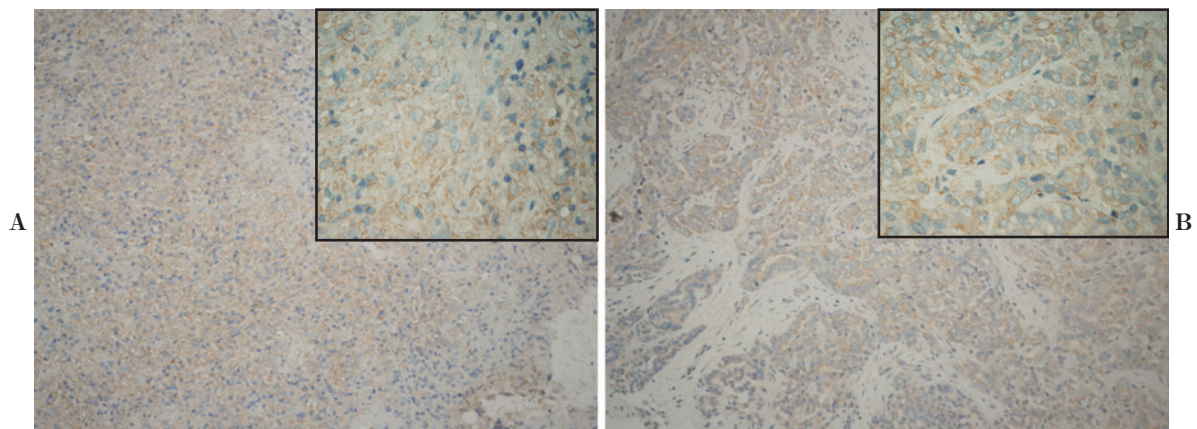


Figure 1. Expression of OPN on mesothelioma tissues with immunohistochemical staining. A representative section of sarcomatoid (A) and epithelial (B) MPM case, OPN immunopositivity was localized within the tumor cells. Magnification for A and B: 200 \times , magnification for inserts of A and B: 400 \times .

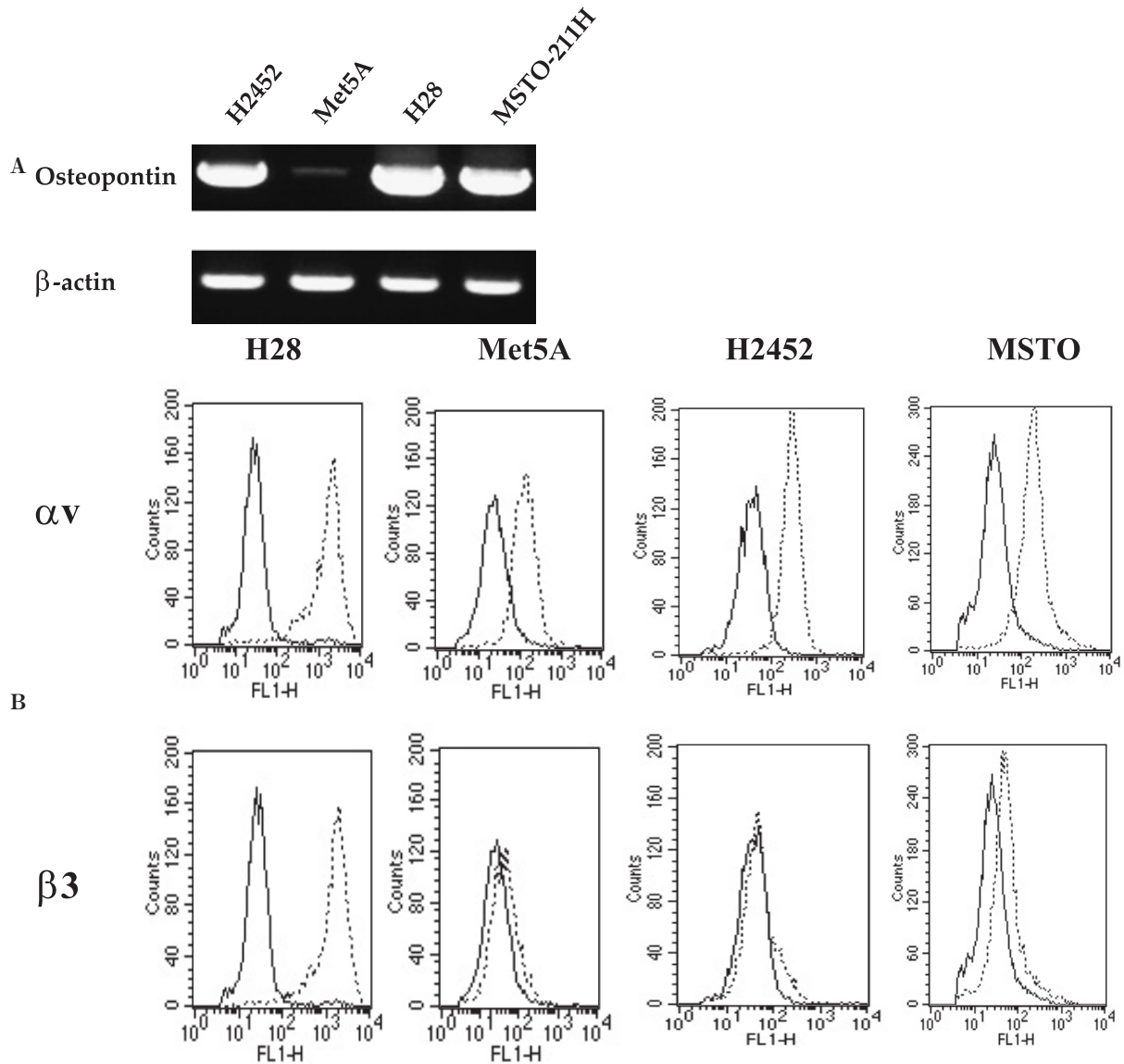


Figure 2. (A) mRNA expression of OPN and β -actin by RT-PCR analysis. Total RNAs were extracted from each cell line and 1 μ g of RNAs was subjected to RT-PCR analysis for OPN (top panel) and β -actin mRNA (bottom panel) expression. OPN expression was strongly detected in H28 cells (sarcomatoid cell type), MSTO-211H cells (biphasic cell type), and H2452 cells (epithelial cell type), while it was weakly detected in Met5A cells (normal mesothelial type) cells with RT-PCR. (B) Expression of integrins on MPM cell lines by flowcytometric analysis. To determine integrin expressions, cells were incubated with monoclonal antibodies and analyzed with a FACScanTM. Note that αv , and $\beta 3$ integrin expressions were predominantly expressed on H28 cells. In contrast, αv , and $\beta 3$ integrins were weakly expressed on other cells. Solid lines indicate background immunofluorescence, while dotted lines indicate the fluorescence intensity of integrins.

Collection, Manassas, VA).

RT-PCR を用いた OPN 発現の検討

TRIzol Reagent を用いて、各組織型の細胞株の mRNA を抽出し、OPN 発現を reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) を用いて検討した。

各プライマーの塩基配列は以下の通りである。

OPN sense primer (5'-GTGATTTGCTTTTGCTCC TA-3'), OPN anti-sense primer (5'-TCCTTACTTTTGGGTCTACA-3'), β -actin sense primer (5'-GGCGGCA ACACCATGTACCCT-3'), β -actin anti-sense primer (A GGGGCCGGACTCGTCATACT).

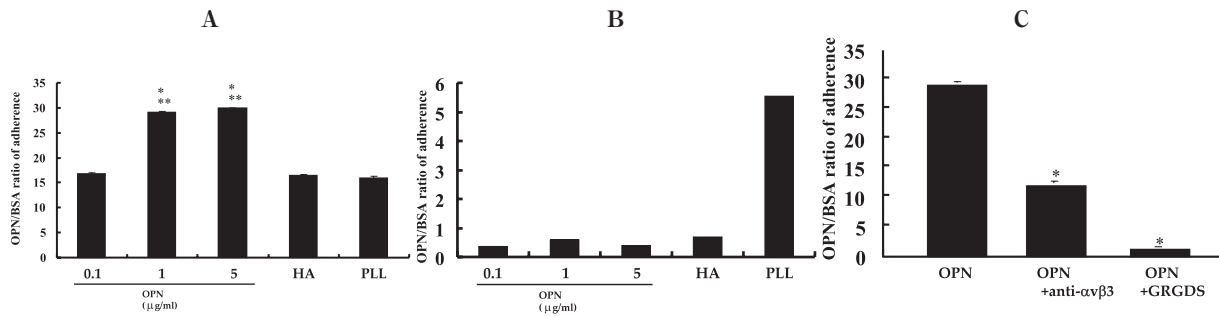


Figure 3. *In vitro* cell adhesion of H28 cells (A) or H2452 cells (B) to OPN, PLL, BSA or HA. Cells were allowed to adhere to wells coated with OPN (0.1 µg/ml, 1 µg/ml, or 5 µg/ml), HA (2 mg/ml), PLL (0.001%) or BSA (10 mg/ml) at 37°C for 1 hr. The OPN/BSA ratio of adherence (percent specific adhesion to OPN/percent adhesion to BSA × 100) is described in the material and methods. H28 showed enhanced adhesion to OPN in a dose dependent manner, while H2452 did not. * $p < 0.0001$ vs. HA, ** $p < 0.0001$ vs. PLL. (C) Effect of anti-human $\alpha v \beta 3$ antibody or GRGDS peptide on H28 binding to OPN. Enhanced adhesion of H28 cells to OPN (1 µg/ml) was abrogated by addition of either anti-human $\alpha v \beta 3$ antibody (10 µg/ml) or GRGDS peptide (100 µM) to the medium. * $p < 0.0001$ vs. OPN. Data are presented as the mean \pm S.D. in triplicates.

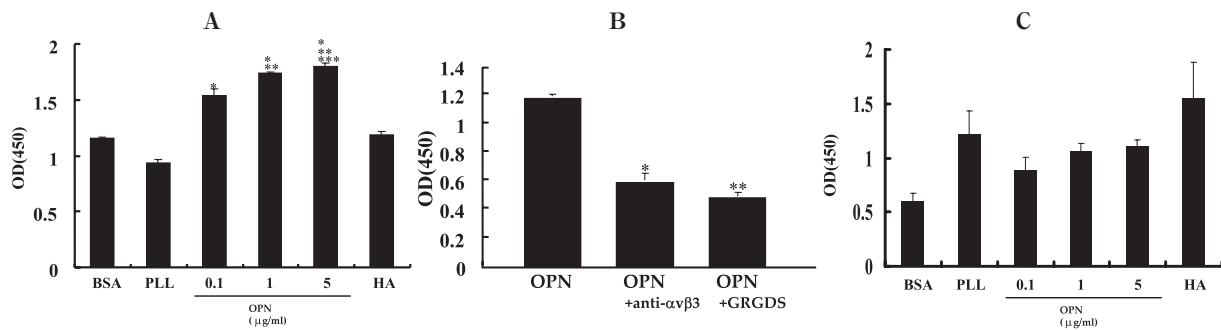


Figure 4. *In vitro* cell proliferation assay. (A) Two thousand H28 or H2452 cells were added to the 96-well microtiter plate coated with OPN (0.1 µg/ml, 1 µg/ml, or 5 µg/ml), PLL (0.001%), BSA (10 mg/ml) or HA (2 mg/ml) in triplicate, and allowed to grow for 3 days. Cell number was assessed with the cell counting kit-8™. H28 cells cultured on OPN coated plates at the indicated concentration demonstrated enhanced proliferation in a dose dependent manner in comparison to the cells cultured on BSA, PLL, or HA. * $p < 0.001$ vs. PLL, ** $p < 0.001$ vs. BSA, *** $p < 0.001$ vs. HA. (B) Inhibitory effect of anti- $\alpha v \beta 3$ antibody (10 µg/ml) or GRGDS peptide (100 µM) on H28 cell proliferation mediated by coated OPN at the concentration of 1 µg/ml. Enhanced proliferation was markedly suppressed with the addition of anti- $\alpha v \beta 3$ antibody (10 µg/ml) or GRGDS peptide (100 µM) to the medium. * p , ** $p < 0.0001$ vs. OPN 1 µg/ml. Data are presented as the mean \pm S.D. in triplicates. (C) In contrast, H2452 cells cultured on OPN coated plate failed to show demonstrate enhanced proliferation. OD: optical density.

フローサイトメトリーによるインテグリン発現の検討

各中皮腫細胞株のインテグリン発現を抗ヒト αv インテグリン抗体 (CD51) と抗ヒト $\beta 3$ インテグリン抗体 (CD61) を用いて評価した。フローサイトメトリーは FACScan™ (Becton-Dickson Co., Mountain View, CA) を使用した。

細胞接着試験

OPN (0.1, 1.0, 5.0 µg/ml), ヒアルロン酸 (2 mg/ml), 0.001% ポリエルリジン, bovine serum albumin (BSA) 10 mg/ml を 96 ウェルプレートに固相化した後, 各細胞株を無血清培地で 1 時間反応させた。プレートを反転後,

遠心し付着細胞の数を cell counting kit-8™ で評価した。

細胞増殖試験

同様に各基質を固相化した ELISA プレート上で各細胞株を培養し 72 時間後に細胞生存度を評価した。

免疫沈降ウエスタンブロッティング

OPN (0.1, 1.0, 5.0 µg/ml), ヒアルロン酸 (2 mg/ml), 0.001% ポリエルリジン, BSA (10 mg/ml) をポリスチレンディッシュに固相化した後, H28 細胞株を無血清培地で 1 時間反応させた。その cell lysates を抗 FAK 抗体, 抗ホスホタイロシン抗体と反応させ, FAK のリン酸化を評価した。

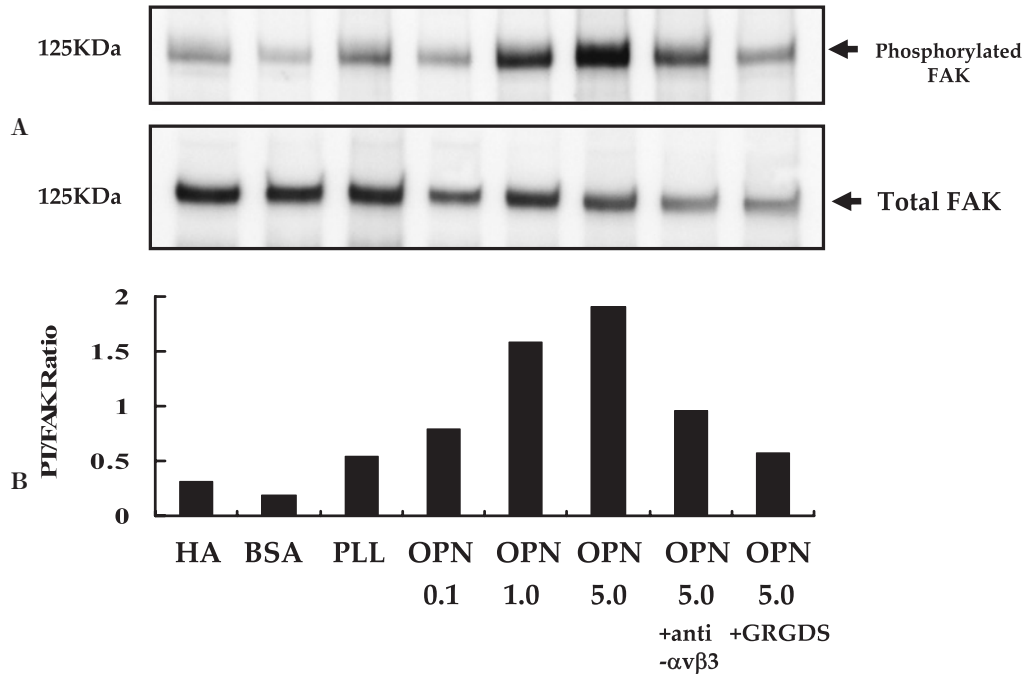


Figure 5. Immunoprecipitation-western blotting analysis for focal adhesion kinase. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase (FAK) was assessed with immunoprecipitation-western blotting. H28 cells were incubated at 37°C for 60 min on dishes coated with OPN (0.1 μ g/ml, 1 μ g/ml, and or 5 μ g/ml), PLL, BSA (10 mg/ml) or HA (2 mg/ml). 5 μ g of cell lysates were immunoprecipitated with anti-FAK antibody, and one-half of the precipitates were subjected to immunoblotting with anti-phosphotyrosine antibodies (top panel). The other half was probed with anti-FAK antibody to confirm the loading amount of total FAK (bottom panel). Note that the enhanced phosphorylation of FAK in H28 cells plated on OPN was observed in a dose dependent manner. In addition, enhanced phosphorylation of FAK in H28 cells toward OPN was abrogated by addition of either anti- α v β 3 antibody (10 μ g/ml) or GRGDS peptide (100 μ M) to the medium (A). The ratio of phosphorylated FAK/total FAK (PT/FAK) of H28 cells cultured on OPN was greater than that on BSA, PLL, or HA (B).

アポトーシス試験

OPN (0.1, 1.0, 5.0 μ g/ml), ヒアルロン酸 (2 mg/ml), 0.001% ポリエルリジン, BSA (10 mg/ml) をポリスチレンディッシュに固相化した後, H28 細胞を無血清培地で 48 時間反応させた. 回収した細胞を Annexin-V FITC kit (Sigma, St. Louis, MO) を用いてアネキシン V との結合を評価した.

細胞遊走試験

細胞遊走試験では, 各濃度の OPN (0.1, 1.0, 5.0 μ g/ml) と BSA (10 mg/ml) をインサートチャンバーの裏側に固相化し, チャンバー内に H28 細胞を蒔いた. 6 時間後に裏側に遊走される細胞数を評価した.

結果

免疫組織化学染色

胸膜中皮腫患者の手術検体に対して抗 OPN 抗体を用

いて免疫組織染色を施行した結果, 肉腫型, 上皮型ともに OPN の強発現を認めた (Figure 1A, 1B).

RT-PCR を用いた OPN 発現の検討

Met5A における OPN 発現は弱かったものの, 他の細胞株 H2452, H28, MSTO-211H ではいずれも OPN の強発現を認めた (Figure 2A).

フローサイトメトリーによるインテグリン発現の検討

各中皮腫細胞株のインテグリンの発現を検討したところ, α v インテグリン発現についてはいずれも強い発現を認めたが, β 3 発現は H28 細胞においてのみ発現が確認された (Figure 2B).

細胞接着試験

H28 細胞の OPN に対する接着性はヒアルロン酸, ポリエルリジンと比較して有意に増加した. しかし, H2452 細胞は OPN に対する接着性は示さなかった. また, H28 細胞と OPN の接着は抗ヒト α v β 3 抗体 (10 μ g/ml) もし

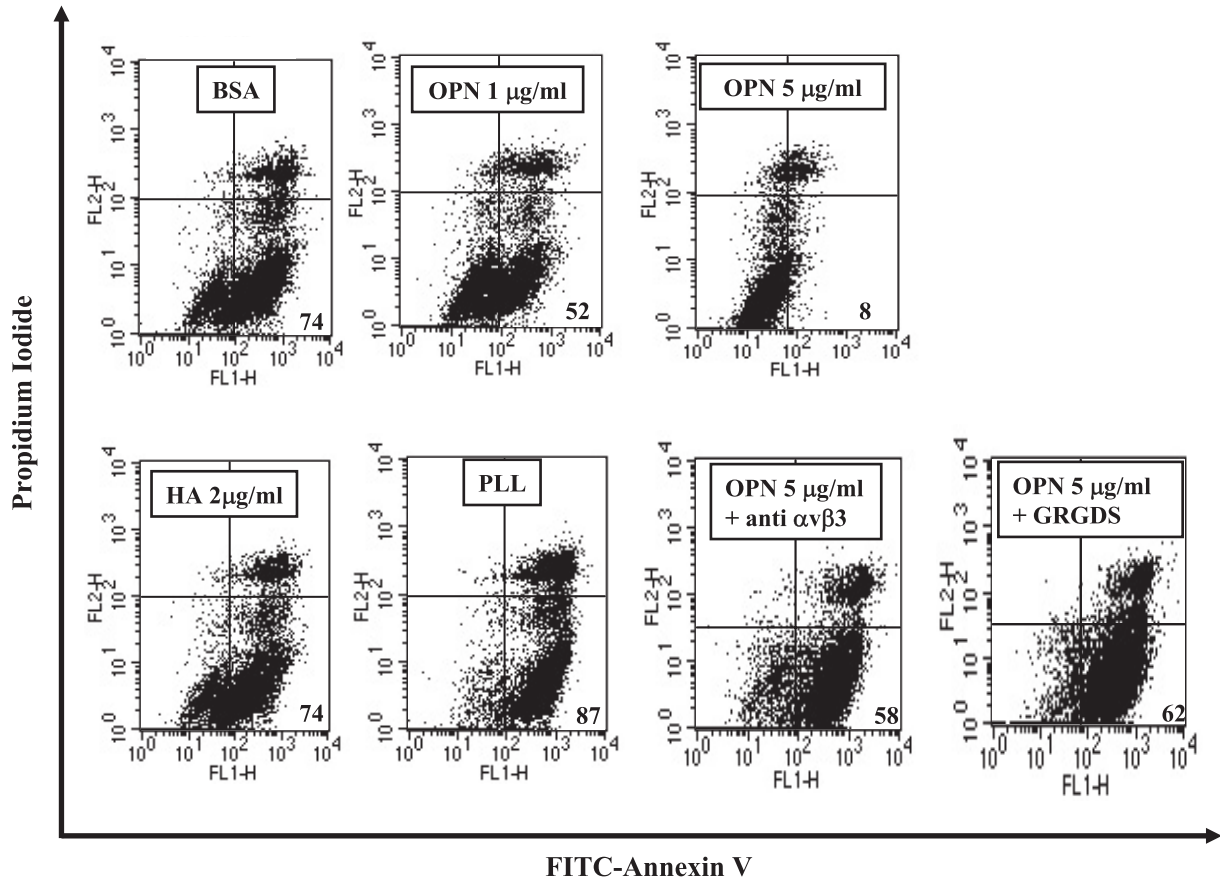


Figure 6. OPN suppressed apoptosis in H28. H28 cells were placed for 48 hr at 37°C on dishes coated with OPN (5 µg/ml), OPN (1 µg/ml), 0.001% PLL, BSA (10 mg/ml) or HA (2 mg/ml). Cells were harvested and stained with FITC-annexin V and propidium iodide for analysis with flowcytometry. Normal viable cells are shown in the left lower quadrant, early apoptotic stage in the right lower quadrant, late apoptotic/necrotic stage in the right upper quadrant, and necrotic stage in the left upper quadrant. The percentage of gated cells in early apoptosis (annexin V positive, propidium iodide negative) in this representative experiment is indicated at the right lower corners. H28 cells cultured on OPN were more viable in comparison to cells cultured on the others. However, anti-apoptosis of H28 cells toward OPN was abrogated with the addition of either anti- $\alpha\beta 3$ antibody (10 µg/ml) or GRGDS peptide (100 µM) to the medium.

くは GRGDS ペプチド (100 µM) で抑制された (Figure 3A, 3B, 3C).

細胞増殖試験

H28 細胞を OPN 上で培養した結果、細胞増殖は濃度依存性に増強した。一方、H2452 細胞では細胞増殖の増強は認められなかった。抗ヒト $\alpha\beta 3$ 抗体 (10 µg/ml) もしくは GRGDS ペプチド (100 µM) で OPN を介する H28 細胞の細胞増殖は抑制された (Figure 4A, 4B, 4C)。

免疫沈降ウエスタンプロティング

H28 細胞を各基質で培養した結果、OPN 上で強い FAK のリン酸化を認めた。FAK のリン酸化は OPN 濃度依存性であり、抗ヒト $\alpha\beta 3$ 抗体 (10 µg/ml) もしくは GRGDS ペプチド (100 µM) で抑制された (Figure 5)。

アポトーシス試験

H28 細胞の各基質上でのアポトーシスをアネキシン V

キットを用いて評価した。OPN 5.0 µg/ml 上で最も強い抗アポトーシス効果を認めた。また、抗ヒト $\alpha\beta 3$ 抗体 (10 µg/ml) もしくは GRGDS ペプチド (100 µM) の前投与で抗アポトーシス効果が抑制された (Figure 6)。

細胞遊走試験

H28 細胞は BSA と比較して OPN に対して濃度依存性の細胞遊走能の亢進を示した。またインサートチャンパー内に各濃度の OPN 溶液を加えた結果、濃度勾配に従った遊走が見られた。遊走阻害試験では抗ヒト $\alpha\beta 3$ 抗体 (10 µg/ml) もしくは GRGDS ペプチド (100 µM) とともに反応させることにより遊走の抑制が確認できた (Figure 7A, 7B, 7C)。

考察

今回、われわれは OPN が 1) 悪性胸膜中皮腫細胞株の

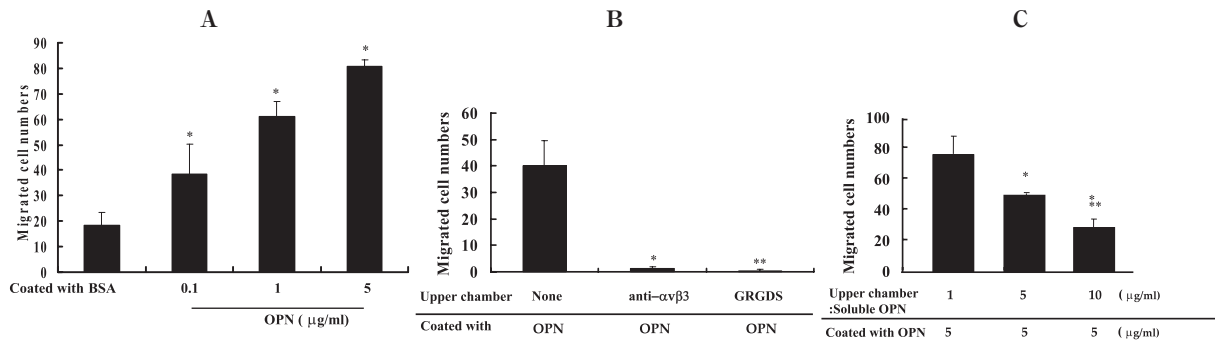


Figure 7. Migration of H28 cells toward OPN. Cells were placed in the upper chamber of a cell culture insert. The reverse sides of the membranes of cell culture inserts were coated with OPN (0.1, 1.0, or 5 μg/ml) or BSA (10 mg/ml). After 6 hr of incubation, cells that migrated through the porous filter were counted at $\times 400$ magnification. **(A)** H28 cells migrated toward immobilized OPN to much greater extent than the cells toward the immobilized BSA. Data are presented as the mean \pm SD. $*p < 0.0001$ vs BSA. **(B)** Enhanced migration of H28 cells towards immobilized OPN (5 μg/ml) was abrogated with the addition of either anti- $\alpha v \beta 3$ antibody (10 μg/ml) or GRGDS peptide (100 μM) to the upper chambers. Data are presented as the mean \pm SD. $*p < 0.0001$ vs none. **(C)** Inhibitory effect of soluble OPN in the upper chamber on the migration of H28 cells towards the reverse side of the filters coated with OPN (5 μg/ml). Enhanced migration of H28 cells was abrogated with the addition of soluble OPN to the upper chambers. Data are presented as the mean \pm SD. $*p < 0.0001$ vs upper chamber (OPN 1 μg/ml). $**p < 0.001$ vs upper chamber (OPN 5 μg/ml).

様々な細胞機能の調節に関与していること、また、2) OPNと $\alpha v \beta 3$ インテグリンを介するシグナル伝達の中皮腫細胞機能の調節に必要であることを明らかにした。すなわち、胸膜中皮腫細胞株H28はOPNとインテグリン受容体を介して会合し、接着、増殖、抗アポトーシス作用、遊走能を増強することが明らかになり、これらの現象にFAKのリン酸化が重要であることを示した。

他の中皮腫細胞株はOPNに対して有意な接着を示さないことから、細胞機能の発現にOPNとの接着が不可欠であることが示唆された。OPNは接着分子である $\alpha v \beta 3$ 、 $\alpha v \beta 5$ 、 $\alpha v \beta 1$ 、CD44といったインテグリンと会合することにより機能発現する。^{18,19} また、 $\alpha v \beta 3/\alpha v \beta 5$ インテグリンアンタゴニストであるS247はアポトーシスと細胞増殖阻害効果を示すことにより、著明な抗腫瘍転移効果と抗血管新生効果を発現する。*in vivo*では、大腸癌からの肝転移の進行阻害と生存の延長を示している。²⁰⁻²² さらに $\alpha v \beta 3$ 発現と癌の進行度の相関も報告されており、そのモノクローナル抗体であるAbegrinTMは固形癌に対する治療においてPhase IIの段階である。²³ Caiらは $\alpha v \beta 3$ インテグリンを発現する腫瘍においてAbegrinTMを用いた化学療法および放射線療法の有効性も明らかにしている。²⁴

悪性胸膜中皮腫においても $\alpha v \beta 3$ インテグリンとOPN結合により生じるシグナルが腫瘍細胞の増殖、遊走に寄与していることが考えられる。悪性胸膜中皮腫患者の治療においても $\alpha v \beta 3$ インテグリンは新たな治療標的分子として挙げられ、今後のさらなる研究が期待される。

REFERENCES

1. Nakano T, Chahinian AP, Shinjo M, Togawa N, Tomomura A, Miyake M, et al. Cisplatin in combination with irinotecan in the treatment of patients with malignant pleural mesothelioma: a pilot phase II clinical trial and pharmacokinetic profile. *Cancer*. 1999;85:2375-2384.
2. Ong ST, Vogelzang NJ. Chemotherapy in malignant pleural mesothelioma. A review. *J Clin Oncol*. 1996;14:1007-1017.
3. Corson JM. Pathology of mesothelioma. *Thorac Surg Clin*. 2004;14:447-460.
4. Klominek J, Rob rt KH, Sundqvist KG. Chemotaxis and haptotaxis of human malignant mesothelioma cells: effects of fibronectin, laminin, type IV collagen, and an autocrine motility factor-like substance. *Cancer Res*. 1993;53:4376-4382.
5. Scarpa S, Giuffrida A, Fazi M, Coletti A, Palumbo C, Pass HI, et al. Migration of mesothelioma cells correlates with histotype-specific synthesis of extracellular matrix. *Int J Mol Med*. 1999;4:67-71.
6. Li Y, Heldin P. Hyaluronan production increases the malignant properties of mesothelioma cells. *Br J Cancer*. 2001;85:600-607.
7. Nasreen N, Mohammed KA, Hardwick J, Van Horn RD, Sanders K, Kathuria H, et al. Low molecular weight hyaluronan induces malignant mesothelioma cell (MMC) proliferation and haptotaxis: role of CD44 receptor in MMC proliferation and haptotaxis. *Oncol Res*. 2002;13:71-78.
8. Giuffrida A, Scarpa S, Birarelli P, Modesti A. The interaction of tenascin-C with fibronectin modulates the migration and specific metalloprotease activity in human mesothelioma cell lines of different histotype. *Int J Oncol*. 2004;25:745-750.

9. Pass HI, Lott D, Lonardo F, Harbut M, Liu Z, Tang N, et al. Asbestos exposure, pleural mesothelioma, and serum osteopontin levels. *N Engl J Med.* 2005;353:1564-1573.
10. Grigoriu BD, Scherpereel A, Devos P, Chahine B, Letourneux M, Lebailly P, et al. Utility of osteopontin and serum mesothelin in malignant pleural mesothelioma diagnosis and prognosis assessment. *Clin Cancer Res.* 2007;13:2928-2935.
11. Furger KA, Menon RK, Tuck AB, Bramwell VH, Chambers AF. The functional and clinical roles of osteopontin in cancer and metastasis. *Curr Mol Med.* 2001;1:621-632.
12. Chakraborty G, Jain S, Behera R, Ahmed M, Sharma P, Kumar V, et al. The multifaceted roles of osteopontin in cell signaling, tumor progression and angiogenesis. *Curr Mol Med.* 2006;6:819-830.
13. Rangaswami H, Bulbule A, Kundu GC. Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression. *Trends Cell Biol.* 2006;16:79-87.
14. Denhardt DT, Guo X. Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J.* 1993;7:1475-1482.
15. Liaw L, Skinner MP, Raines EW, Ross R, Cheresh DA, Schwartz SM, et al. The adhesive and migratory effects of osteopontin are mediated via distinct cell surface integrins. Role of alpha v beta 3 in smooth muscle cell migration to osteopontin in vitro. *J Clin Invest.* 1995;95:713-724.
16. Furger KA, Allan AL, Wilson SM, Hota C, Vantighem SA, Postenka CO, et al. Beta(3) integrin expression increases breast carcinoma cell responsiveness to the malignancy-enhancing effects of osteopontin. *Mol Cancer Res.* 2003;1:810-819.
17. Bautista DS, Xuan JW, Hota C, Chambers AF, Harris JF. Inhibition of Arg-Gly-Asp (RGD)-mediated cell adhesion to osteopontin by a monoclonal antibody against osteopontin. *J Biol Chem.* 1994;269:23280-23285.
18. Brown LF, Papadopoulos-Sergiou A, Berse B, Manseau EJ, Tognazzi K, Perruzzi CA, et al. Osteopontin expression and distribution in human carcinomas. *Am J Pathol.* 1994;145:610-623.
19. Weber GF, Ashkar S, Glimcher MJ, Cantor H. Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science.* 1996;271:509-512.
20. Reinmuth N, Liu W, Ahmad SA, Fan F, Stoeltzing O, Parikh AA, et al. Alphavbeta3 integrin antagonist S247 decreases colon cancer metastasis and angiogenesis and improves survival in mice. *Cancer Res.* 2003;63:2079-2087.
21. Kumar CC. Integrin alpha v beta 3 as a therapeutic target for blocking tumor-induced angiogenesis. *Curr Drug Targets.* 2003;4:123-131.
22. Abdollahi A, Griggs DW, Zieher H, Roth A, Lipson KE, Saffrich R, et al. Inhibition of alpha(v)beta3 integrin survival signaling enhances antiangiogenic and antitumor effects of radiotherapy. *Clin Cancer Res.* 2005;11:6270-6279.
23. Mulgrew K, Kinneer K, Yao XT, Ward BK, Damschroder MM, Walsh B, et al. Direct targeting of alphavbeta3 integrin on tumor cells with a monoclonal antibody, Abegrin. *Mol Cancer Ther.* 2006;5:3122-3129.
24. Cai W, Wu Y, Chen K, Cao Q, Tice DA, Chen X. In vitro and in vivo characterization of ⁶⁴Cu-labeled Abegrin, a humanized monoclonal antibody against integrin alpha v beta 3. *Cancer Res.* 2006;66:9673-9681.