

Osteopontina: un nuovo marker di interessamento osseo in oncologia

Paola Cafforio, Maddalena Campagna, Franco Silvestris
Dipartimento di Medicina Interna e Oncologia, Università degli Studi di Bari

ABSTRACT

Osteopontin: a new marker of bone involvement in oncology

Osteopontin is a phosphoglycoprotein of bone matrix expressed by a number of cells, in which it activates adhesion, chemotaxis, and signal transduction by its binding to several biologically active molecules. Also, it may exert both anti- and pro-inflammatory effects, as demonstrated by its expression on T and NK cells, and macrophages. In bone physiologic turnover, osteopontin is secreted by osteoblasts in bone matrix and induces chemoattraction of osteoclasts by the binding with $\alpha v \beta 3$ integrin, while inhibiting the deposition of new bone tissue by osteoblasts. Several tumors produce osteopontin for their survival and the protein may be measured at high levels in sera from patients with skeleton metastases. In particular, in multiple myeloma both cellular expression and solubilization of osteopontin by malignant plasma cells correlate with the extension of osteolytic lesions. Therefore, in some tumors associated with skeletal devastation, measurement of soluble osteopontin levels may be useful for prognostic evaluations.

RIASSUNTO

L'osteopontina è una fosfoglicoproteina della matrice ossea, espressa da vari tipi di cellule nelle quali attiva adesione, chemiotassi e trasduzione di segnali legandosi a molecole biologicamente attive. Possiede effetti anti- e pro-infiammatori, come si evince dalla sua espressione su cellule T ed NK e sui macrofagi. L'osteopontina, coinvolta nel riassorbimento osseo, viene prodotta e depositata dagli osteoblasti nella matrice. In seguito al legame con l'integrina $\alpha v \beta 3$, essa induce chemioattrazione degli osteoclasti sulla matrice e inibisce la neoapposizione di tessuto osseo da parte degli osteoblasti. Alcuni tumori secernono osteopontina per la propria sopravvivenza ed elevati livelli sierici della molecola sono spesso associati a metastasi ossee. In particolare, nel mieloma multiplo l'espressione e la solubilizzazione di osteopontina da parte delle plasmacellule correlano con l'estensione delle lesioni osteolitiche. È verosimile pertanto che in alcune patologie tumorali caratterizzate dalla progressiva distruzione scheletrica, l'osteoponti-

INTRODUZIONE

Nell'ultimo ventennio l'interesse di alcuni gruppi di ricerca è stato richiamato da una nuova proteina, identificata dapprima come prodotto di secrezione di cellule tumorali maligne e denominata "2ar", e riconosciuta successivamente, su cellule CD4⁺ con il nome "Eta-1" (*early T-cell activation-1*). Analisi di sequenza di Eta-1 suggerivano infatti una omologia strutturale con una proteina della matrice extracellulare dell'osso precedentemente identificata come "osteopontina" (OPN). In seguito, sono stati condotti studi multidisciplinari allo scopo di meglio definire la bioattività dell'OPN e le possibili patologie connesse a difetti di regolazione. I risultati di questi studi consentono oggi di attribuire all'OPN la capacità di mediare i segnali tra cellule e tra matrice e cellule in cui viene attivata la funzione *homing*. Un ulteriore ruolo è stato inoltre descritto nei processi flogistici in quanto l'OPN si è rivelata molecola ad attività sia pro- che anti-infiammatoria, ma anche nei meccanismi di riassorbimento osseo potendo essa mediare l'adesione degli

osteoclasti alla matrice, nonché nel sistema immunitario in quanto molecola capace di indurre la produzione di citochine Th1 con attività citotossica.

Per la molteplicità delle sue funzioni biologiche, l'OPN è stata studiata nell'ambito di numerose patologie con implicazioni flogistiche e immunitarie tra le quali artrite reumatoide, sclerosi multipla e sarcoidosi, nonché in malattie del distretto osseo quali osteoartriti ed osteoporosi. Un notevole interesse ha inoltre suscitato il possibile ruolo dell'OPN in oncologia, in particolare nella progressione e metastatizzazione di neoplasie ad interessamento osseo tra cui carcinomi della mammella e della prostata e nel mieloma multiplo. In tal senso sono stati indirizzati alcuni recenti studi nel nostro laboratorio, con particolare riguardo all'espressione di OPN su plasmacellule mielomatose per la capacità di queste ultime di invadere e distruggere il sistema scheletrico. Per la gravità di questa malattia e per il ruolo espletato dall'OPN nella progressione tumorale, è possibile ipotizzarne un uso clinico quale potenziale marker (1).

PROPRIETÀ STRUTTURALI E FUNZIONALI

L'OPN è una fosfoglicoproteina di circa 60 KDa, costituita da 314 aminoacidi (2) (Fig.1). Come già accennato, essa è stata isolata dalla matrice ossea extracellulare (3), ma viene espressa anche da diversi tipi cellulari tra cui osteoblasti, osteoclasti, macrofagi, linfociti T attivati, cellule muscolari lisce, epiteliali e gangliari ed è componente strutturale di alcuni tessuti quali midollo, placenta, rene ed epitelii secretivi (4). In forma solubile è presente in vari liquidi biologici tra cui sangue, urine e latte (5), e partecipa in maniera attiva a eventi fisiopatologici quali il rimodellamento osseo, l'angiogenesi, la cicatrizzazione e alcuni processi flogistici dell'apparato osteo-scheletrico.

La principale funzione dell'OPN riguarda i meccanismi di adesione intercellulare. A questo scopo, la proteina esprime una sequenza aminoacidica Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (8) capace di attivare l'adesività di osteoblasti, osteoclasti e fibroblasti con alcune integrine ($\alpha\beta 1$ - $\beta 3$ - $\beta 5$) e, al tempo stesso, di implementare la chemiotassi e la trasduzione intracellulare di specifici segnali (9). Il legame molecolare dell'OPN con le suddette integrine è inoltre responsabile dell'attivazione di specifiche tirosin-chinasi, che trasducono segnali specifici in risposta a stimoli intra- ed extracellulari. L'adesione cellulare è altresì mediata dal legame dell'OPN con molecole diverse dalle integrine quali il CD44, glicoproteina di superficie che consente una forma di adesività diversificata tra cellula e substrato, ma anche tra cellula e cellula. Questa molecola è iper-regolata in corso di processi flogistici acuti e cronici e lega l'OPN con le varianti CD44v6 e CD44v7 (10).

Un aspetto importante della struttura dell'OPN è la presenza di un sito di clivaggio per la trombina in stretta prossimità con la regione GRGDS, ubicato tra i residui di Arg¹⁶⁹-Ser¹⁷⁰ ed essenziale nel regolare la funzione della proteina stessa. Infatti, il clivaggio genera due catene polipeptidiche di 35 kDa ed una variazione conformazionale capace di rendere accessibile il sito ai recettori di superficie. Questi ultimi possono legare sia l'OPN clivata che l'OPN nativa, ma l'interazione con la prima isoforma induce esaltazione delle funzioni attribuite alla molecola (11).

Il clivaggio dell'OPN ad opera della trombina è di notevole interesse, in quanto la proteina idrolizzata espone un sito di legame per le integrine $\alpha 9\beta 1$ (12) e $\alpha 4\beta 1$ (13), identificato nella sequenza SVVYGLR, non altrimenti visibile ai recettori specifici sul peptide in tutta la sua lunghezza. Le proprietà funzionali dell'OPN clivata differiscono da quelle della proteina nativa (14), confermando l'importanza del clivaggio proteolitico quale meccanismo di induzione della

bioattività dell'OPN.

La maggior parte dell'OPN circolante è scissa dalla trombina durante i processi di coagulazione sia in condizioni fisiologiche che durante processi flogistici, neoplastici e di riparazione tissutale (15). È stato osservato che l'OPN aumenta nella tonaca muscolare delle arterie a seguito di eventi flogistico-traumatici contemporaneamente all'attivazione della trombina (16). Inoltre, l'OPN funge da substrato per le metalloproteasi MMP-3 (stromelysin-1) e MMP-7 (matrilysin), esponendo siti di clivaggio differenziati per le due metalloproteasi, sebbene entrambe utilizzino un sito adiacente a quello per la trombina nella porzione N-terminale (17). L'azione proteolitica delle metalloproteasi genera in tutto cinque frammenti, uno dei quali è compreso tra quelli N-terminali e contiene la sequenza RGD.

Il ruolo biologico delle modificazioni proteolitiche dell'OPN è dimostrabile *in vitro* con l'induzione di una maggiore adesione e migrazione cellulare in modelli sperimentali che utilizzano tessuti flogistici o cellule di tumori solidi (18). L'espressione e l'attivazione delle metalloproteasi è infatti significativamente aumentata in vari processi patologici e l'anomala regolazione di metalloproteasi e OPN è costantemente riscontrabile nel fisiologico rimodellamento tissutale (19) e in linee cellulari tumorali caratterizzate da esaltazione dei processi proliferativi.

OPN E FLOGOSI

Recenti studi hanno chiarito almeno in parte il ruolo dell'OPN nella regolazione delle funzioni cellulari nei siti infiammatori e nella riparazione di tessuti, e ciò ha consentito di attribuire alla molecola effetti al tempo stesso anti-infiammatori e pro-infiammatori (20). La molecola è infatti ampiamente espressa da cellule T, macrofagi e cellule NK nell'ambito delle lesioni flogistiche, in cui espleta azione anti-infiammatoria inibendo la produzione di ossido nitrico (NO) (21). Anche nell'artrite reumatoide e nell'osteoartrite, patologie ovviamente associate

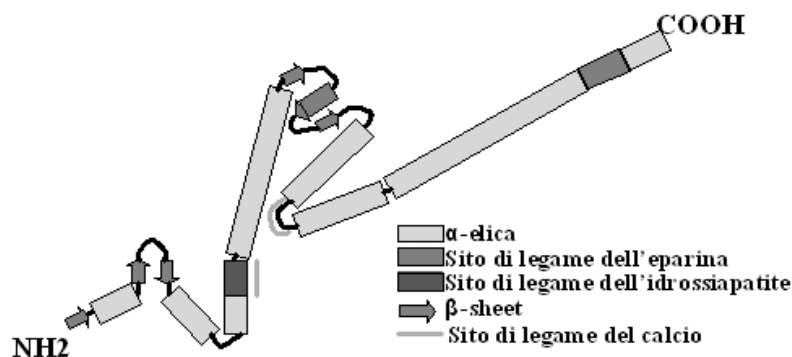


Figura 1
Struttura conformazionale dell'osteopontina (OPN) con indicazione dei siti di legame della proteina.

a flogosi articolare cronica, l'espressione di OPN è elevata nel liquido sinoviale in cui essa riduce la sintesi di NO (22) e di prostaglandina E2 (23).

Per quanto riguarda l'effetto pro-infiammatorio, l'OPN stimola la chemiotassi di cellule T e macrofagi. In virtù della sua capacità di attivazione della chemiotassi nei macrofagi, essa è implicata nella formazione dei granulomi per cui l'espressione cellulare di OPN è solitamente aumentata in alcune malattie granulomatoze, tra le quali la sarcoidosi e la tubercolosi (20). Infatti, l'iniezione sottocutanea di OPN provoca accumulo di macrofagi nella sede di inoculazione (24). Nell'artrite reumatoide, in particolare, l'OPN prodotta dai fibroblasti pericondrali richiama macrofagi, cellule T e granulociti neutrofili nelle sedi articolari colpite dal processo flogistico. Tra le azioni pro-infiammatorie della proteina va inoltre ricordata la sua capacità di stimolare l'espressione della collagenasi 1 (metalloproteasi 1), enzima patogeneticamente rilevante nella distruzione della cartilagine articolare che caratterizza la sinovite reumatoide.

Il ruolo biologico dell'OPN nella risposta immune non è ancora ben definito. Infatti, mentre espleta azione di reclutamento dei macrofagi ed attiva la produzione di citochine dell'immunità cellulo-mediata, l'OPN svolge anche attività citotossica se prodotta da cellule NK e cellule T attivate, nelle quali viene appunto denominata Eta-1. In questi modelli funzionali l'OPN è apparentemente in grado di polarizzare in senso Th1 la risposta immunitaria (25) e, a conferma del suo possibile coinvolgimen-

to in vari processi flogistici regolati da fenomeni di citotossicità, valori elevati della proteina sono riscontrabili nel lupus eritematoso sistemico, nell'artrite reumatoide e nella sclerosi multipla in cui è stata osservata una correlazione lineare dei suoi livelli circolanti con la gravità clinica di malattia. Infine, aumenti costitutivi di OPN sono stati associati a peculiari aplotipi B e C del gene la cui elevata frequenza predisporrebbe alcuni soggetti allo sviluppo di malattie autoimmuni (26).

La Figura 2 descrive gli effetti pro- e anti-infiammatori dell'OPN ed i suoi meccanismi di azione nella risoluzione del processo flogistico e del danno tissutale.

OPN E RIMODELLAMENTO OSSEO

L'OPN rappresenta la maggiore componente non collagene della matrice ossea extracellulare, attivamente coinvolta nei meccanismi di riassorbimento osseo da parte degli osteoclasti (27). La proteina viene infatti direttamente prodotta dagli osteoblasti e depositata in prossimità dell'interfaccia della matrice extracellulare dell'osso con la zona di riassorbimento osteoclastico. La maggiore deposizione in questa sede è dovuta alla marcata affinità dell'OPN con l'idrossiapatite, componente minerale dell'osso, in virtù della sua natura acida, del suo elevato grado di fosforilazione e per la presenza di 9-10 residui di aspartato nell'estremità NH₂ terminale della molecola (28).

Pertanto, la presenza di OPN sui cristalli di idrossia-



Figura 2

Caratteristiche principali delle proprietà pro- e anti-infiammatorie dell'OPN e degli eventi molecolari correlati.

patite induce chemioattrazione degli osteoclasti che aderiscono alla matrice adiacente l'integrina $\alpha v \beta 3$, ligando complementare dell'OPN (29). Altre molecole sono tuttavia coinvolte nei meccanismi di chemiotassi e adesione degli osteoclasti. Tra queste, il CD44 viene indotto dall'OPN sulla superficie degli osteoclasti e stimola direttamente la motilità degli osteoclasti e l'adesione alla matrice per il riassorbimento osseo. Esperimenti condotti su topi OPN^{-/-} hanno dimostrato il ruolo funzionale della molecola, in quanto gli osteoclasti perdono la propria mobilità ed esprimono in minor misura il recettore CD44 rispetto agli osteoclasti di topi *wild-type* (30). In tale modello sperimentale di topo *knock-out* per l'OPN, la somministrazione di OPN esogena ripristina la motilità e vitalità degli osteoclasti nonché la normale espressione di CD44. Questi dati dimostrano che l'OPN è coinvolta nella funzione osteoclastica, è prodotta in parte con meccanismo autocrino, regola l'espressione di CD44 ed altre funzioni vitali degli osteoclasti durante il riassorbimento osseo. Infatti, adesione, migrazione e riassorbimento osseo sono eventi sequenziali della funzione osteoclastica ai quali l'OPN partecipa direttamente. Dopo l'espletamento di tali funzioni, la proteina viene disattivata mediante defosforilazione ad opera di TRAP (*tartrate-resistant acid phosphatase*), che favorisce il distacco degli osteoclasti a riassorbimento concluso (31).

L'espressione dell'OPN è regolata da citochine e ormoni ed è stimolata da stress meccanici, *in vivo e in vitro* (32). È stato ipotizzato che le sollecitazioni meccaniche sull'osso possono indurre riassorbimento osseo secondario all'aumentata produzione di OPN nella matrice ossea extracellulare (33). In un esperimento condotto su topi *wild-type* e topi OPN^{-/-} sottoposti a stress meccanico (*tail suspension*), è stato osservato mediante analisi con μ -CT (*micro-x-ray computed tomography*) che nei primi erano presenti segni di rarefazione ossea, assenti invece nel secondo gruppo di topi. Questi risultati suggeriscono che, per effetto dello stress meccanico, l'OPN potrebbe regolare il reclutamento e l'attivazione degli osteoclasti e, pertanto, fungere da sensore di attivazione del riassorbimento osseo. Altri studi indicano l'OPN quale sensore di inibizione della funzione osteoblastica in risposta alle sollecitazioni meccaniche. È stato infatti dimostrato che topi OPN^{-/-}, sottoposti a *tail suspension* per evitare lo stress gravitazionale, presentano normale neodeposizione di matrice ossea contrariamente a topi *wild-type* in cui viene osservata una scarsa neoformazione ossea (34). L'OPN è pertanto necessaria sia per indurre il riassorbimento mediante attivazione della funzione osteoclastica, sia per sopprimere la neoapposizione di tessuto osseo inibendo la funzione osteoblastica. Tuttavia, l'evidenza che topi OPN^{-/-} sviluppano una normale struttura ossea e non manifestano difetti morfologici dimostra che l'OPN non è indispensabile per il normale sviluppo osseo (35).

L'OPN ha un ruolo significativo anche nell'osteoporosi

si post-menopausale e nelle neoplasie con interessamento osseo. È ben noto che l'osteoporosi è una delle più comuni patologie che colpisce donne in età post-menopausale in relazione alla ridotta produzione di estrogeni. Tenendo conto di quanto detto finora sul ruolo biologico dell'OPN nel rimaneggiamento osseo, è possibile ipotizzare un suo coinvolgimento anche nell'osteoporosi post-menopausale. Per meglio esaminare il ruolo dell'OPN in questo processo, sono stati condotti studi sul riassorbimento osseo dopo ovariectomia eseguita sia in topi OPN^{-/-} che in topi *wild-type*. Tali studi hanno dimostrato che i topi *knock-out* sono resistenti alla perdita ossea indotta dalla ovariectomia rispetto a topi *wild-type* che, al contrario, mostrano un intenso turnover metabolico a carico del tessuto osseo (6).

OPN E TUMORI

Elevati livelli sierici di OPN sono stati più volte dimostrati nel corso di neoplasie a diffusione ossea quali i carcinomi della mammella, della prostata, della tiroide e del polmone (36). Infatti, i livelli plasmatici della glicoproteina sono solitamente aumentati in pazienti con carcinoma della prostata non responsivo al trattamento ormonale ed in pazienti con carcinoma mammario con metastasi ossee (37). Il valore medio dell'OPN sierica in un gruppo di volontari sani è stato valutato intorno a 90 ng/ml, mentre esso è di 142 ng/ml in pazienti con carcinoma della prostata e carcinoma mammario (38). Pertanto, è verosimile che le stesse cellule tumorali producano OPN, sebbene il meccanismo con cui essa influenza l'infiltrazione ossea e la crescita tumorale non sia ancora ben definito. Alcuni studi ipotizzano che la sua interazione con $\alpha v \beta 3$ ed altre molecole funzionali (tra cui il CD44) favorisca l'adesione, la migrazione e la crescita delle metastasi proteggendole al tempo stesso dalla sorveglianza immunologica e dall'apoptosi (39). Altre osservazioni hanno dimostrato che l'OPN espleta un effetto inibitorio diretto sull'apoptosi, sia favorendo la sopravvivenza delle cellule tumorali mediante attivazione di NF κ B (40), sia riducendo l'attività citolitica del complemento mediante il fattore H (41), proteina plasmatica multifunzionale, regolatrice dell'attivazione complementare e capace di reagire con ligandi multipli tra cui la stessa OPN. Infine, l'OPN è apparentemente coinvolta anche nell'angiogenesi tumorale, in quanto il legame con $\alpha v \beta 3$ inibisce l'apoptosi delle cellule endoteliali *in vitro* mediante attivazione di NF κ B, con conseguente aumento della rete vascolare ed incremento della crescita tumorale.

L'OPN si lega specificamente a componenti della matrice extracellulare e, come tale, rappresenta il substrato per il legame con la transglutaminasi attraverso i residui di glutamina (42). Questo legame è probabilmente necessario per immobilizzare la proteina alla matrice extracellulare e consentire l'ancoraggio delle cellule

tumorali dopo la loro fuoriuscita dal letto vascolare (43).

L'OPN prodotta *in vivo* dai tumori viene solubilizzata ed è pertanto dosabile nei fluidi extracellulari (44). Inoltre, essa viene regolarmente prodotta dai macrofagi che infiltrano i tumori in quantità maggiori rispetto alle stesse cellule tumorali, per cui l'aumento dell'espressione sierica di OPN nel corso di neoplasie correla negativamente con la progressione tumorale.

OPN E MIELOMA MULTIPLO

Come è noto, il mieloma multiplo è una neoplasia ematologica caratterizzata dalla proliferazione incontrollata nella matrice scheletrica di un singolo clone plasmacellulare, per cui si osserva un patologico riassorbimento osseo con formazione di lesioni litiche multifocali (45). Questa complicanza comporta la progressiva distruzione ossea ed è responsabile della grave sintomatologia dolorosa e della maggiore suscettibilità alle fratture. L'interessamento dello scheletro è tuttavia dovuto non solo all'invasione e proliferazione del clone maligno nel tessuto osseo, ma anche all'alterata regolazione dei fenomeni di rimaneggiamento osseo che interessano sia gli osteoblasti che gli osteoclasti (46). Evidenze sperimentali documentano come, nel microambiente osseo, le cellule neoplastiche interagiscano con molteplici tipi cellulari che mantengono le proprie funzioni anche in presenza di malattia.

Le alterazioni responsabili delle lesioni osteolitiche comprendono l'aumento dell'attività osteoclastogena e l'inibizione della funzione osteoblastogena. Il rimaneggiamento osseo esercitato dagli osteoclasti è riconducibile a vari fattori paracrini ed autocrini. Inizialmente fu identificato un unico "fattore di attivazione degli osteoclasti" (*osteoclast-activating factor: OAF*) (47), secreto dalle plasmacellule mielomatose, i cui livelli sierici correlano con l'estensione delle lesioni ossee nel singolo paziente (48). Tuttavia, altre molecole solubili ritrovate nel microambiente midollare sono potenzialmente coinvolte nei fenomeni di patologico riassorbimento osseo, tra cui quelle a maggiore attività osteoclastogena comprendono IL6, MIP-1 α , RANKL, OPG e OPN (49).

Uno studio recente (50) sull'espressione dell'OPN da parte di neoplasie B linfocitarie conferma la produzione spontanea di OPN da parte di linee tumorali di mieloma e di alcuni linfomi, per cui i suoi livelli plasmatici in pazienti con MM sono per lo più aumentati rispetto a pazienti con altre malattie ematologiche e, talora, correlano con la progressione della malattia (50). Anche nell'ambito della stessa popolazione mielomatosa, i pazienti con malattia ossea attiva manifestano titoli circolanti più elevati rispetto ai pazienti senza lesioni ossee.

Studi recenti effettuati nel nostro laboratorio su campioni di midollo e biopsie ossee provenienti da pazienti con MM a diverso stadio di malattia e con MGUS (gammapatia monoclonale di significato non definito) hanno evidenziato una stretta correlazione tra livelli di OPN

solubile e progressione di malattia.

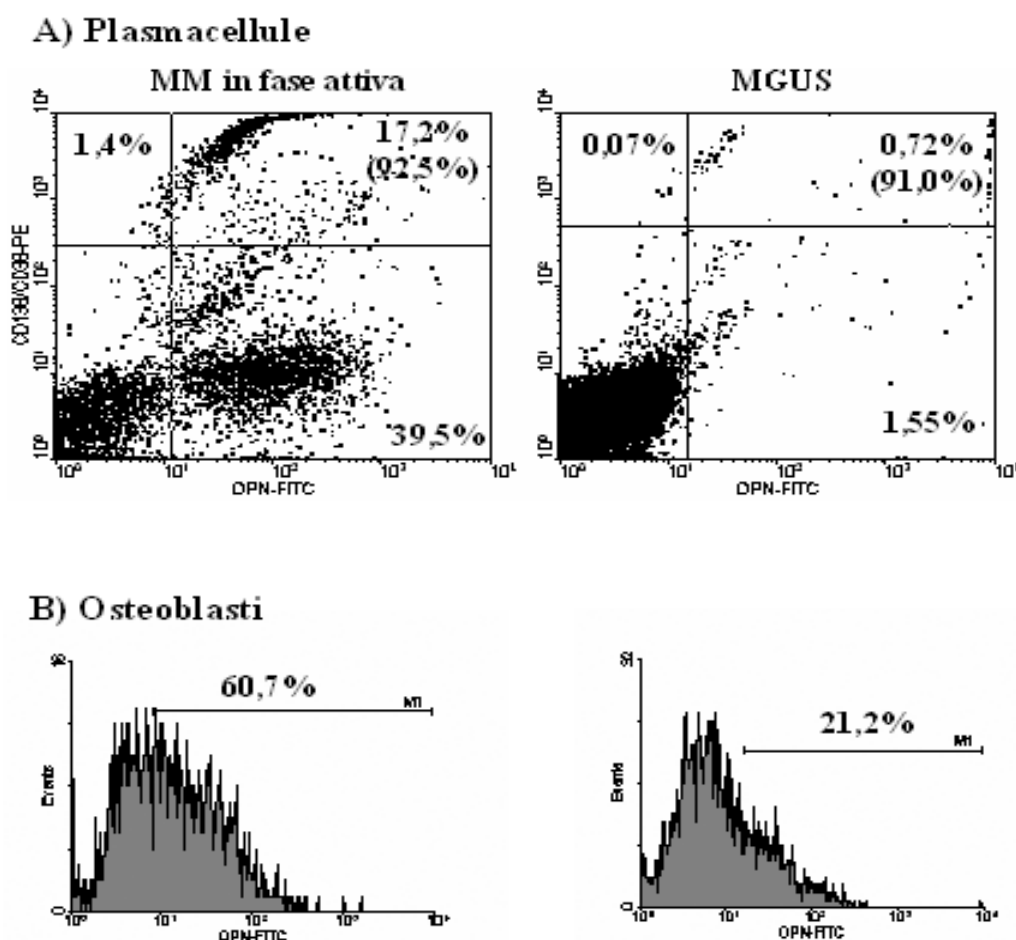
La produzione di OPN da parte delle cellule mielomatose è stata valutata mediante citofluorimetria in doppia fluorescenza con un anticorpo monoclonale anti-CD138 coniugato con ficoeritrina per distinguere le plasmacellule CD138⁺ dalle restanti popolazioni midollari. Al fine di valutare la presenza intracitoplasmatica dell'OPN, le cellule sono state preventivamente fissate e permeabilizzate con paraformaldeide e digitonina. L'analisi citofluorimetrica, effettuata sulle plasmacellule midollari CD138⁺, ha evidenziato in ogni caso un'elevata espressione di OPN sia nei pazienti con malattia in fase attiva ($82,4\% \pm 15,2$ delle cellule OPN⁺) sia in quelli con malattia in remissione o con MGUS ($86,2\% \pm 9,8$). È stata invece riscontrata una variazione significativa ($P < 0,02$) nella percentuale di cellule midollari CD138⁻ che esprimevano OPN nei pazienti con MM in fase attiva ($47,2 \pm 3,5$) rispetto ai pazienti con MGUS ($5,7 \pm 4,9$) (3A).

La stessa analisi citofluorimetrica, condotta su colture di osteoblasti purificati da biopsie ossee di pazienti con MM, ha mostrato un'elevata espressione di OPN ($70,2\% \pm 5,4$) rispetto a quella riscontrata su osteoblasti di soggetti normali o con MGUS ($34,7\% \pm 7,8$) (Fig. 3B). Tali risultati confermano una maggiore produzione di OPN da parte delle plasmacellule midollari nei pazienti con MM, sia in fase attiva che in remissione o con MGUS. Le differenze più significative si osservano invece nell'espressione di tale molecola da parte delle restanti cellule presenti nel microambiente midollare ed osseo, presumibilmente coinvolte nei fenomeni di regolazione dell'invasione plasmacellulare.

Infine, il dosaggio dei livelli circolanti di OPN mediante metodica ELISA ha documentato una minore concentrazione della proteina nei pazienti con malattia in remissione, in assenza di lesioni osteolitiche o con MGUS (valore medio: $0,018 \mu\text{g/ml} \pm 0,003$) rispetto a quella presente nei pazienti con malattia stabile e con lesioni osteolitiche (valore medio: $0,037 \mu\text{g/ml} \pm 0,013$), che raggiungeva il limite di $0,07 \mu\text{g/ml}$ nel paziente n. # 3 (Fig. 4A). In particolare, in un paziente con malattia altamente aggressiva caratterizzata da plasmocitomi dei tessuti molli e crolli vertebrali multipli, il dosaggio dell'OPN ha mostrato livelli singolarmente elevati ($40 \mu\text{g/ml}$), con pronta riduzione ($5 \mu\text{g/ml}$) a seguito di chemioterapia con talidomide e desametasone (Fig. 4B).

CONCLUSIONI

Le ricerche più recenti sull'OPN evidenziano un suo diretto coinvolgimento nella genesi e nella progressione tumorale, in particolar modo nelle neoplasie con coinvolgimento osseo per il diretto effetto di attivazione dell'adesione e migrazione delle cellule tumorali nel compartimento osseo (39). In virtù della molteplicità delle sue funzioni, i meccanismi biomolecolari innescati dall'OPN sono tuttora in fase di studio in numerose patologie con

**Figura 3**

A) Espressione dell'OPN in plasmacellule mielomatose. Le immagini citofluorimetriche rappresentative delle popolazioni in studio evidenziano l'elevata espressione di OPN da parte delle plasmacellule di pazienti con MM in fase attiva (92,5% di cellule OPN+) e con MGUS (91,0%). Le maggiori differenze di espressione si osservano invece nelle restanti cellule midollari (39,5% vs 1,5%). **B)** Espressione citoplasmatica di OPN sugli osteoblasti. Gli istogrammi rivelano l'aumentata espressione di OPN su osteoblasti di pazienti con MM in fase attiva (60,7% di cellule OPN+) rispetto ai pazienti con MGUS (21,2%).

implicazioni flogistiche e immunitarie, con interessamento osseo ovvero nell'ambito di malattie neoplastiche.

Nel nostro laboratorio è stata ricercata una correlazione tra i livelli di OPN nel MM e la progressione della malattia caratterizzata dalla comparsa o dall'estensione di lesioni osteolitiche. L'analisi citofluorimetrica delle popolazioni midollari ha evidenziato una produzione confrontabile di OPN da parte delle plasmacellule nei pazienti con MM a diverso stadio di malattia ed MGUS. Differenze significative di espressione della molecola sono state invece osservate a carico delle rimanenti cellule presenti nel microambiente midollare ed osseo. Infine, anche i livelli sierici di OPN correlavano con la gravità della malattia ed in particolare con la presenza di lesioni osteolitiche multifocali e di plasmocitomi diffusi ai tessuti molli. E' pertanto ipotizzabile che la produzione di

OPN, notevolmente esaltata durante la progressione di malattia, possa contribuire direttamente ai meccanismi di chemiotassi e di adesione delle plasmacellule nei siti di metastatizzazione, favorendo i processi litici nell'osso.

E' possibile ipotizzare un ruolo di marcatore bioumorale per l'OPN. Il suo dosaggio, infatti, unitamente ai parametri definiti da Durie e Salmon (48), potrebbe essere utilizzato a scopi clinici sia nella stadiazione della malattia, sia nel giudizio prognostico. Inoltre, poiché i livelli di OPN si riducono in seguito a chemioterapia convenzionale, le sue variazioni possono riflettere la risposta terapeutica.

Considerazioni analoghe potrebbero valere anche in altre patologie neoplastiche con interessamento osseo quali i carcinomi della mammella e della prostata.

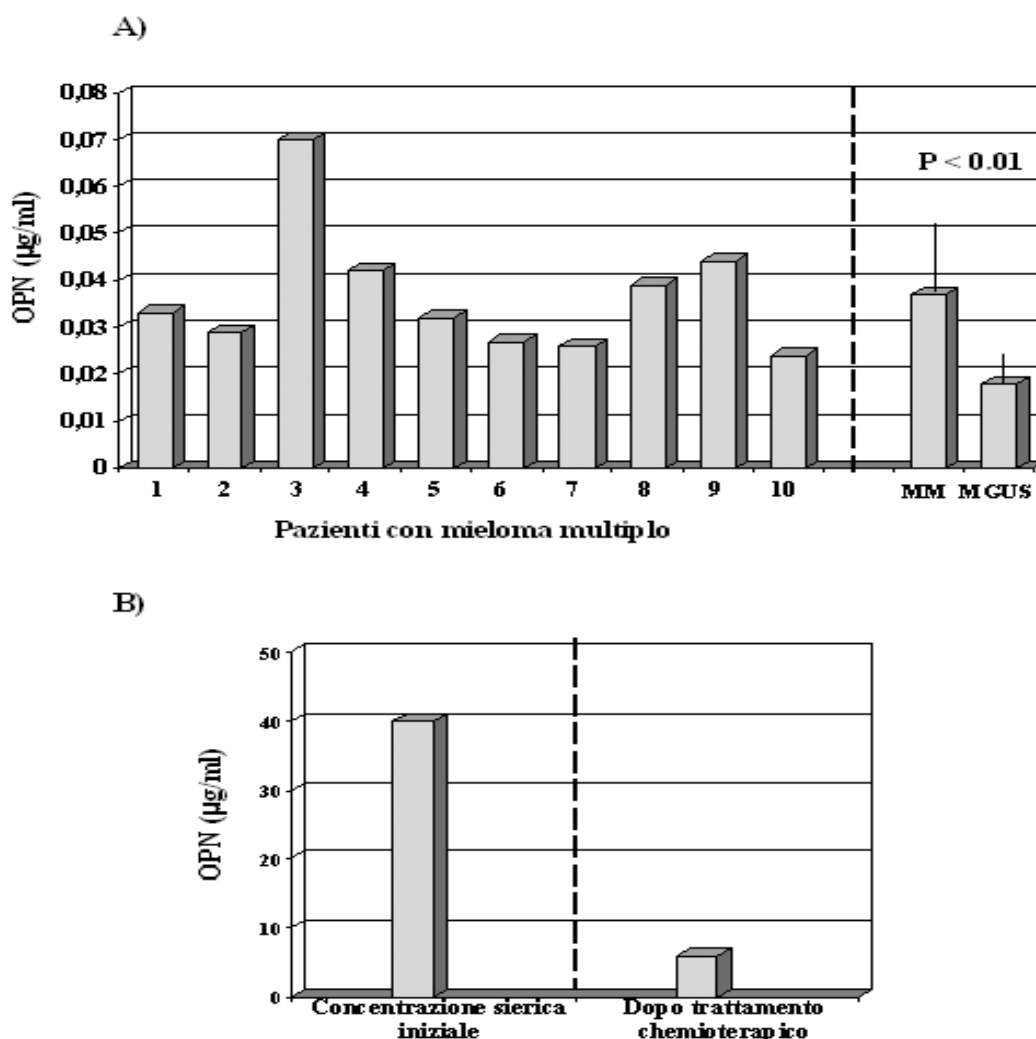


Figura 4

A) Livelli circolanti di OPN in corso di MM ed MGUS. - Significativi aumenti di OPN solubile sono stati riscontrati in un gruppo di 10 pazienti con MM in fase attiva. Nel grafico sono rappresentati i singoli dosaggi di OPN, nonché il corrispondente valore medio dei pazienti con MM ($0,037 \mu\text{g/ml} \pm 0,013$) confrontato con i livelli medi in un gruppo di 14 pazienti con MGUS ($0,018 \mu\text{g/ml} \pm 0,003$) la cui differenza risultava statisticamente significativa ($P < 0,01$).

B) Variazione dei livelli sierici di OPN dopo terapia. Nel grafico sono rappresentati i livelli di OPN solubile nel siero di un paziente con plasmocitoma dei tessuti molli ed interessamento scheletrico prima e dopo chemioterapia (talidomide + dexametasone). L'incremento della molecola solubile, superiore ai valori medi degli altri pazienti ($40 \mu\text{g/ml}$), mostra una drammatica riduzione ($5 \mu\text{g/ml}$) dopo il trattamento terapeutico.

BIBLIOGRAFIA

- Weber GF, Cantor H. The immunology of Eta-1/Osteopontin. Cytokine Growth Factor Rev 1996;7:241-248.
- Hijiya N, Setoguchi M, Matsuura K, Higuchi Y, Akizuki S et al. Cloning and characterization of the human osteopontin gene and its promoter. Biochem J 1994;303:255-262.
- Prince CW, Oosawa T, Butler WT, Tomana M, Bhowm M et al. Isolation, characterization, and biosynthesis of a phosphorylated glycoprotein from rat bone. J Biol Chem 1987; 262:2900-2907.
- Denhardt DT, Gou X. Osteopontin: a protein with diverse functions. FASEB J 1993;7:1475-1482.
- Giachelli CM, Steitz S. Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. Matrix Biol 2000;19:615-622.
- Yoshitake H, Rittling SR, Denhardt DT, Noda M. Osteopontin-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption. Proc Natl Acad Sci 1999;96:8156-8160.
- Ohshima S, Yamaguchi N, Nishioka K, Mima T, Ishii T et al. Enhanced local production of osteopontin in rheumatoid joints. J Rheumatol 2002;29:2061-2067.

8. Oldberg A, Franzén A, Heinegard D. Cloning and sequence analysis of a rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:8819-8823.
9. Miyauchi A, Alvarez J, Greenfield EM, Teti A, Grano M, et al. Recognition of osteopontin and related peptides by α 3 integrin stimulates cell signals in osteoclasts. *J Biol Chem* 1991;266:20369-20374.
10. Katagiri YU, Sleeman J, Fujii H, Herrlich P, Hotta H et al. CD44 variants but not CD44s cooperate with beta 1-containing integrins to permit cells to bind to osteopontin independently of arginine-glycine-aspartic acid, thereby stimulating cell motility and chemotaxis. *Cancer Res* 1999;59:219-226.
11. Senger DR, Perruzzi CA, Papadopoulos-Sergiou A, Van De Water L. Adhesive properties of osteopontin: regulation by a naturally occurring thrombin-cleavage in close proximity to the GRGDS cell-binding domain. *Mol Biol Cell* 1994;5:565-574.
12. Smith LL, Cheung HK, Ling LE, Chen J, Sheppard D et al. Osteopontin N-terminal domain contains a cryptic adhesive sequence recognized by α 9beta1 integrin. *J Biol Chem* 1996;271:28485-28491.
13. Bayless KJ, Davis GE. Identification of dual α 4beta1 integrin binding sites within a 38 amino acid domain in the N-terminal thrombin fragment of human osteopontin. *J Biol Chem* 2001;276:13483-13489.
14. O'Regan AW, Chupp GL, Lowry JA, Goetschkes M, Mulligan N et al. Osteopontin is associated with cells in sarcoid granulomas and has T cell adhesive and cytokine-like properties in vitro. *J Immunol* 1999;162:1024-1031.
15. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 1986;315:1650-1659.
16. Giachelli CM, Bae N, Almeida M, Denhardt DT, Alpers CE et al. Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1993;92:1686-1696.
17. Agnihotri R, Crawford HC, Horo H, Matrisian LM, Havrda MC et al. Osteopontin, a novel substrate for matrix metalloproteinase-3 (Stromelysin-1) and matrix metalloproteinase-7 (Matrilysin). *J Biol Chem* 2001;276:28261-28267.
18. Sodek J, Ganss B, Mckee MD. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000;11:279-303.
19. Wilson CL, Heppner KJ, Rudolph LA, Matrisian LM. The metalloproteinase matrilysin is preferentially expressed by epithelial cells in a tissue-restricted pattern in the mouse. *Mol Biol Cell* 1995;6:851-869.
20. Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D, Berman JS. Osteopontin as a means cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling and cell survival. *J Clin Invest* 2001;107:1055-1061.
21. Tian JY, Sorensen ES, Butler WT, Lopez CA, Sy MS et al. Regulation of NO synthesis induced by inflammatory mediators in RAW 264.7 cells: collagen prevents inhibition by osteopontin. *Cytokine* 2000;12:450-457.
22. Scott JA, Weir ML, Wilson SM, Xuan JW, Chambers AF et al. Osteopontin inhibits inducible nitric oxide synthase activity in rat vascular tissues. *Am J Physiol* 1998;275:H2258-H2265.
23. Attur MG, Dave MN, Stuchin S, Kowalski AJ, Steiner G et al. Osteopontin: an intrinsic inhibitor of inflammation in cartilage. *Arthritis Rheum* 2001;44:578-584.
24. O'Regan A, Berman LS. Osteopontin: a key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation. *Int J Exp Pathol* 2000;81:373-390.
25. Ashkar S, Weber GE, Panoutsakopoulou V, Sanchirico ME, Janson M et al. Eta-1 (osteopontin): an early component of type 1 (cell-mediated) immunity. *Science* 2000;287:860-864.
26. Chiocchetti A, Indelicato M, Bensi T, Mesturini R, Giordano M et al. High levels of osteopontin associated with polymorphisms in its gene are a risk factor for development of autoimmunity/lymphoproliferation. *Blood* 2004;103:1376-1382.
27. Mckee MD, Farach CM, Butler WT, Hanschka PV, Nanci A. Ultrastructural immunolocalization of noncollagenous (osteopontin and osteocalcin) and plasma (albumin and alpha 2HS-glycoprotein) proteins in rat bone. *J Bone Miner Res* 1993;8:485-496.
28. Dodds RA, Connor JR, Jamas IE, Rykaczewski EL, Appelbaum E et al. Human osteoclasts, not osteoblasts deposit osteopontin onto resorption surfaces: an in vitro and ex vivo study of remodeling bone. *J Bone Miner Res* 1995;10:1666-1680.
29. Reinholt FP, Hultenby K, Oldberg A, Heinegard D. Osteopontin - a possible anchor of osteoclast to bone. *Proc Natl Acad Sci* 1990;87:4473-4475.
30. Challaiah MA, Kizer N, Biswas R, Alvarez U, Strauss-Schoenberger J et al. Osteopontin deficiency produces osteoclast dysfunction due to reduced CD44 surface expression. *Mol Biol Cell* 2003;14:173-189.
31. Ek-Rylander B, Flores M, Wendel M, Heinegard D, Andersson G. Dephosphorylation of osteopontin and bone sialoprotein by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. *J Biol Chem* 1994; 269:14853-14856.
32. Teray K, Takano-Yamamoto T, Ohba Y, Hiura K, Sugimoto M et al. Role of osteopontin in bone remodeling caused by mechanical stress. *J Bone Miner Res* 1999;14:839-849.
33. Duncan RL, Turner CH. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif Tissue Int* 1995;57:344-358.
34. Ishijima BM, Rittling SR, Yamashita T, Tsuji K, Kurosawa H et al. Enhancement of osteoclastic bone resorption and suppression of osteoblastic bone formation in response to reduced mechanical stress do not occur in the absence of osteopontin. *J Exp Med* 2001;193:399-404.
35. Rittling SR, Denhardt DT. Osteopontin function in pathology: lessons from osteopontin-deficient mice. *Exp Nephrol* 1999;7:103-113.
36. Ibrahim T, Leong I, Sanchez-Sweetman O, Khokha R, Sodek J, Tenenbaum HC et al. Expression of bone sialoprotein and osteopontin in breast cancer bone metastases. *Clin Exp Metastasis* 2000;18:253-260.
37. Withold W, Armbruster FP, Karmatschek M, Reinauer H.

- Bone sialoprotein in serum of patients with malignant bone-diseases. *Clinical Chem* 1997;43:85-91.
38. Hotte SJ, Winqvist EW, Stitt L, Wilson SM, Chambers AF. Associations with survival and metastasis to bone in men with hormone-refractory prostate carcinoma. *Cancer* 2002;95:506-512.
39. Rosol TJ. Pathogenesis of bone metastasis: role of tumor-related proteins. *J Bone Miner Res* 2000;15:844-850.
40. Scatena M, Almeida M, Chaisson ML, Fausto N, Nicosia RF et al. NFkB mediates alphav-beta3 integrin-induced endothelial cell survival. *J Cell Biol* 1998;141:1083-1093.
41. Fedarko NS, Fohr B, Robey PG, Young MF, Fisher LW. Factor binding to bone sialoprotein and osteopontin enables tumor evasion of complement-mediated attack. *J Biol Chem* 2000;275:16666-16672.
42. Sorensen ES, Rasmussen LK, Moller L, Jensen PH, Hojreys P et al. Localization of transglutaminase-reactive glutamine residues in bovine osteopontin. *Biochem J* 1994;304:13-16.
43. Kaartinen MT, Pirhonen A, Linnala-Kankkunen A, Maenpaa PH. Cross-linking of osteopontin by tissue transglutaminase increases its collagen binding properties. *J Biol Chem* 1999;274:1729-1735.
44. Rittling SR, Denhardt DT. Osteopontin function in pathology: lessons from osteopontin-deficient mice. *Exp Nephrol* 1999;7:103-113.
45. Roodman GD. Mechanisms of bone lesion in multiple myeloma and lymphoma. *Cancer* 1997; 80:1557-1563.
46. Bataille R, Chappard D, Klein B. Mechanism of bone lesions in multiple myeloma. *Hematol/Oncol Clin North Am* 1992;6:285-295.
47. Mundy GR, Raisz LG, Cooper RA. Evidence for the secretion of an osteoclast-stimulating factor in myeloma. *N Engl J Med* 1974;291:1041-1046.
48. Durie BGM, Salmon SE, Mundy GR. Relation of osteoclast activating factor production to the extent of bone disease in multiple myeloma. *Br J Haematol* 1981;47:21-30.
49. Tricot GJ. New insights into role of microenvironment in multiple myeloma. *Int J Hematol* 2002;76:334-6.
50. Saeki Y, Mima T, Ishii T, Ogata A, Kobayashi H et al. Enhanced production of osteopontin in multiple myeloma: Clinical and pathogenic implications. *Br J Haematol* 2003;123:263-270.