

【背景】悪性胸膜中皮腫（MPM）の治療効果や予後予測に関するバイオマーカーが各方面で模索されている。ペメトレキセド（PEM）はMPMに対し有効性が証明されているが、その薬剤感受性メカニズムは明らかでない。近年、肺癌においてはEGFR遺伝子変異、ALK融合遺伝子、RET融合遺伝子が見つかり、その阻害薬が有効であることから、新たなaddicted oncogeneであることが示唆されている。これまでMPMのaddicted oncogeneは見つかっていない。また、MPMに対する薬物療法の効果も限定的であり、その薬剤感受性因子の同定は、臨床上切に望まれており、バイオマーカーを用いた新たな治療戦略の構築が求められている。

【目的】MPMのPEM感受性関連遺伝子の同定とそのメカニズムの解明を試みた。

【方法】6つのMPM細胞株（H28, H2452, H2052, 211H, MESO1, MESO4）を用いた。各細胞株のPEM感受性をMTS-assay法で評価し、IC50により感受性群（3細胞株）と耐性群（3細胞株）に分類した。Affimetrix HG-U133A Gene Chipsにより両群で発現差のある遺伝子をスクリーニングし、real time RT-PCR法を用いて検証した後、pathway解析を行った。得られた標的遺伝子について詳細に機能解析を行うとともに、患者組織標本を検証した。

【結果】Gene Chipsによるスクリーニングの結果、感受性群と耐性群で有意差のある遺伝子を同定した。Pathway解析の結果、12の遺伝子が感受性と有意に相関しており、特にSPP1/Osteopontin (OPN)がPEM感受性因子の中心的な標的であることを明らかにした。ウェスタンブロット及び定量的RT-PCRの結果、SPP1/OPNが感受性群で過剰発現していた。siRNAを用いてSPP1/OPNをknockdownするとPEM感受性が低下し、lenti-virusを用いてSPP1/OPNを強制発現させるとinvasion activityの著しい上昇がみられた。耐性株にSPP1を過剰発現させると、p-AKTが高発現した。一方で、SPP1が高発現している感受性株においてSPP1をknockdownすると、p-AKTおよびAKTの発現が低下した。しかし、耐性株ではSPP1をknockdownしてもAKTおよびp-AKTの発現は高いままで変化はなか

った。また、感受性株で PEM を処理すると、p-AKT は著しく抑制された。対照的に、耐性株では SPP1 の発現が低いために PEM を処理しても p-AKT および AKT の発現に変化は認めなかった。さらに SPP1/OPN と PI3K/AKT 経路の関係を評価するために、PI3K 阻害薬 (wortmannin) を使用した。まず、感受性株と耐性株共に、wortmannin により p-AKT が抑制されることを確認した。次に、wortmannin、siSPP1 あるいは PEM を同時に処理して細胞増殖の変化を観察した。SPP1/OPN が高発現している感受性株において、PEM または siSPP1 と wortmannin を同時に処理すると、細胞増殖の著しい抑制を認めた。対照的に、耐性株では wortmannin は細胞増殖を抑制したが、siSPP1 との相乗効果は観察されなかった。これらの結果は、SPP1/OPN が AKT の活性化を通じて PEM 感受性に関与することを示唆した。患者組織標本での OPN 免疫染色結果でも PEM 感受性との相関が認められた。SPP1/OPN が陽性であった MPM 患者のうちの 2 人は PEM 併用化学療法に対して部分奏効 (PR) を示した。一方、SPP1/OPN が陰性であった MPM 患者 3 人は PR には至らなかった。

【考察】 SPP1/OPN は、その受容体であるインテグリンおよび CD44 に結合することによって、細胞外マトリックスコンポーネントおよびサイトカインの両方の機能を有する。SPP1/OPN は様々な悪性腫瘍で高発現しており、細胞増殖、転移およびアポトーシスに関与することが報告されている。従来の研究では、血清と胸水中の SPP1/OPN の高いレベルが MPM 患者の中で観察されており、SPP1/OPN は診断のバイオマーカーとして有用とされている。本研究では、新たに MPM における PEM の感受性予測マーカーとして SPP1/OPN を提唱するものである。PEM 感受性株の SPP1/OPN の発現は、耐性細胞株と比較して著しく高かった。SPP1/OPN の過剰発現は、p-AKT の発現を増加させた。PEM 感受性株では、PEM 治療により p-AKT を阻害し、SPP1 発現を抑制した。これらの結果は、SPP1/OPN が AKT 活性化を通じての MPM の増殖に直接的な働きを有していることを示唆する。一方で、耐性株では、SPP1 の発現が低下しているために、PI3K 経路を通じた AKT 活性化によ

り抵抗性を獲得している可能性が考えられた。患者組織標本における SPP1/OPN の免疫染色結果からは、MPM 患者の PEM 併用化学療法の効果を予測する可能性の裏付けがなされた。従って、SPP1/OPN は MPM における PEM の感受性予測バイオマーカーとしての有用性を示唆された。

**【結語】**SPP1/OPN は MPM における single predictive biomarker になり得ると考えられた。