

論文の内容の要旨

論文題目 生理活性脂質リゾホスファチジン酸産生酵素としてのオートタキシン ～臨床検査への応用に向けて～

指導教員 矢富 裕 教授
東京大学大学院医学系研究科
平成 17 年 4 月入学
医学博士課程
内科学専攻
氏名 増田 亜希子

【目的】 リゾホスファチジン酸(LPA)は、細胞増殖・運動促進作用、血小板凝集作用、平滑筋細胞収縮作用など、多彩な生理活性を示す代表的なリゾリン脂質性メディエーターである。LPA は、卵巣癌、前立腺癌、大腸癌など、様々な腫瘍の進展に関与することが示されている。加えて、LPA は、脳の形態形成、生殖などの病態生理機能にも関与することが明らかになっている。LPA は血清・血漿などに存在し、細胞表面の特異的受容体(LPA₁, LPA₂, LPA₃, LPA₄, LPA₅)を介して作用すると考えられている。

オートタキシン(ATX)は細胞運動促進因子としてメラノーマ細胞の培養上清から単離された蛋白質であり、リゾホスファチジルコリン(LPC)から LPA の産生を触媒するリゾホスホリパーゼ D(lysoPLD)活性を有する。ATX は、膠芽細胞腫、前立腺癌、乳癌、ホジキンリンパ腫(HL)など、様々な腫瘍組織で高発現しており、LPA 産生を介して、腫瘍の進展に関与すると考えられている。HL の細胞株では、Epstein Barr ウイルス(EBV)により ATX の発現が誘導され、腫瘍細胞の増殖や生存が促進されることが示された。また、LPA が B リンパ芽球の増殖を促進し、B リンパ球の細胞株や慢性リンパ性白血病の細胞で抗アポトーシス作用を示すことも報告されており、ATX と LPA は造血器腫瘍の病態形成に関与すると考えられている。一方で、LPA は着床・妊娠など、生殖でも重要な役割を果たすことが示唆されている。LPA₃ が受精卵の着床に促進的な役割をもつこと、正常妊婦の血清 ATX 活性は非妊娠女性に比べて有意に高値であることが示されている。

以上のように、ATX と LPA は、悪性腫瘍の病態や、生殖などの生理機能との関連が示唆されている。ATX と LPA は血中に存在し、その定量測定のための臨床検査への応用に向けて、基礎的検討が進められてきた。ATX は血中 LPA 濃度を決定する重要な因子であり、その

抗原量は各種病態を反映していると想定される。そこで、今回、私は、最近開発された ATX の免疫学的測定法の臨床検査への応用を目的とし、その測定法の臨床的有用性について評価を行った。第一章では、血清 ATX 抗原量測定 of 腫瘍マーカーとしての有用性を評価するため、造血器腫瘍患者を対象に測定を行った。第二章では、血清 ATX 抗原量測定が、妊娠経過の血清マーカーになりうるか評価するため、正常妊婦、妊娠高血圧症候群(PIH)などの合併症妊婦を対象に、血清 ATX 抗原量を測定した。

第一章 造血器腫瘍患者の血清オートタキシン抗原量測定：濾胞性リンパ腫における臨床的有用性

〈方法〉 2005～2007年に東大病院血液・腫瘍内科、都立府中病院輸血科で治療を受け、同意の得られた造血器腫瘍患者 161名を対象とした。同意の得られた健常者 120名の血清検体をコントロールとして用いた。バキュロウイルス発現系にて作成した ATX 抗原を免疫して得たモノクローナル抗体により、エンザイムイムノアッセイ(EIA)法を開発し、全自動 EIA 装置 AIA-600II(東ソー)を用いて血清 ATX 抗原量を測定した。血漿 LPA 濃度は酵素サイクリング法で、血漿 LPC 濃度は酵素法で測定した。フローサイトメトリーを用いて細胞表面の ATX 発現を測定した。統計解析には JMP6 を用いた。

〈結果〉 健常者 120名の血清 ATX 抗原量平均値は 0.731 ± 0.176 mg/L(平均±標準偏差)、95%信頼区間(95%CI)は 0.468 - 1.134 mg/L であった。健常者女性 (0.852 ± 0.184 mg/L, 95%CI: 0.625 - 1.323 mg/L) では、男性 (0.656 ± 0.121 mg/L, 95%CI: 0.438 - 0.914 mg/L) に比べて、有意に高値であった($P < 0.001$)。濾胞性リンパ腫 (FL) 患者の血清 ATX 抗原量(1.471 ± 0.693 mg/L)は、健常者に比べて有意に高値であった($P < 0.001$)。男女合わせて比較できるようにするため、当該患者の血清 ATX 抗原量を当該患者と同性の血清 ATX 抗原量平均値で割った値を「ATX ratio」と定義し、各疾患で比較すると、血清 ATX 抗原量実測値と比較した場合と同様の結果が得られた。FL 患者 25名を病期や予後因子などで 2群に分類し、血清 ATX 抗原量を比較すると、LDH 高値、 β_2 -マイクログロブリン > 3 mg/L、最大腫瘍径 > 7 cm の群では、そうでない群に比べて有意に高値であった。FL 患者の血清 ATX 抗原量は、可溶性 IL-2 レセプター、 β_2 -マイクログロブリン、LDH と有意に相関していたが、炎症マーカーである CRP との相関はみられなかった。FL の診断における血清 ATX 抗原量の感度・特異度を評価するため、ROC 曲線を作成したところ、カットオフ値を 0.839 mg/L としたとき、感度は 0.84、特異度は 0.80 であった。多くの FL 患者で、臨床経過と血清 ATX 抗原量の推移が一致していた。FL 患者の血漿 LPA 濃度は、血清 ATX 抗原量と相関していた。フローサイトメトリーでは、FL 患者の腫瘍細胞の

ATX 発現が確認された。

第二章 妊婦の血清オートタキシン抗原量測定

〈方法〉 2006～2007 年に東大病院女性診療科・産科を受診し、同意の得られた 36 名の正常妊婦、15名のPIH患者、7名の早産妊婦を対象とした。第一章と同じ非妊娠健常女性46名のデータをコントロールとして用いた。血清 ATX 抗原量の測定は第一章と同様の方法で行った。PIH 患者で上昇すると報告されている soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt-1)も併せて ELISA 法にて測定した。統計解析は第一章と同様の方法で行った。

〈結果〉 正常妊婦の血清 ATX 抗原量は、妊娠週数と有意に正の相関を示した($r = 0.809$, $P < 0.001$)。1st trimester の正常妊婦の血清 ATX 抗原量(1.961 ± 0.450 mg/L)は、非妊娠女性(0.852 ± 0.184 mg/L)に比べて有意に高値であった($P < 0.001$)。分娩後の正常妊婦の血清 ATX 抗原量は、非妊娠に近いレベルまで低下した。3rd trimester の PIH 患者の血清 ATX 抗原量は、正常妊婦に比べて有意に低値であった($P = 0.04$)。1st trimester の PIH 患者の血清 ATX 抗原量は、正常妊婦に比べて、有意ではないが低い傾向がみられた($P = 0.06$)。異なる妊娠週数の妊婦のデータをより正確に比較するため、血清 ATX 抗原量実測値を測定時の妊娠週数で割った値を「ATX pregnancy index」と定義したところ、1st trimester, 3rd trimester のいずれも、PIH 患者では健常者に比べて有意に低値であった。PIH 患者では、血清 ATX 抗原量と血清 sFlt-1 の間に、有意な相関はみられなかった。3rd trimester の正常妊婦と早産妊婦で血清 ATX 抗原量を比較したとき、有意差はみられなかった。

【考察】

我々は、血清 ATX 測定の臨床検査への応用を目的とし、基礎的検討を進めてきた。

第一章では、FL 患者の血清 ATX 抗原量が、健常者に比べて有意に高値であることが示された。ATX はもともと腫瘍細胞運動促進因子として同定されたが、悪性腫瘍患者で血清 ATX 活性が上昇することは報告されておらず、本研究は悪性腫瘍患者で血清 ATX 抗原量が高値となることを示した最初の報告である。一方で、FL 患者の血清 ATX 抗原量の分布は、不均一かつ分散が大きい。血清 ATX 抗原量は、単独で即診断可能となるような血清マーカーではないが、炎症など他の要因の影響を受けにくいこと、病勢をよく反映していることから、有用なマーカーとなりうると思われる。

本研究では、FL 患者の血漿 LPA 濃度は、血清 ATX 抗原量と相関して上昇していた。血漿 LPA 濃度は、産生と分解のバランスにより調節されると考えられているが、過去の報告

および本研究の結果を併せて考えると、LPA 濃度を決定する因子としては、ATX を介する産生経路の方がより重要であると考えられる。フローサイトメトリーで FL の腫瘍細胞の ATX 発現が確認されていることから、FL 患者では、腫瘍細胞による ATX 産生亢進によって血清 ATX 抗原量が上昇している可能性がある。これは、ATX 代謝阻害によると思われる慢性肝疾患での血清 ATX 上昇と対照的である。FL では、ATX が LPA 産生を介して、腫瘍の進展に寄与している可能性があり、今後の解明が期待される。

第二章では、妊婦の血清 ATX 抗原量が高値であることが示され、これは血清 ATX 活性が高値であるとする徳村らの報告に合致する所見であった。血清 ATX 抗原量は分娩直後に非妊娠女性に近いレベルまで低下しており、ATX は胎盤で産生されている可能性がある。ATX は血管形成に必須であることが *in vivo* で示されており、ATX は胎盤形成過程、さらには PIH の病態にも関与している可能性がある。また、PIH 患者の血清 ATX 抗原量は、妊娠初期から低い傾向がみられるため、PIH の早期発見のマーカーとなる可能性がある。

血清 ATX 抗原量は FL の有用なマーカーとなりうることが示された。また、妊婦における血清 ATX 抗原量測定も、PIH の早期診断のマーカーとなる可能性がある。以上のことから、血清 ATX 抗原量測定は、臨床検査医学的応用が十分可能であると考えられた。また、FL の進展に、LPA や ATX が関与している可能性も示唆された。リゾリン脂質と造血器腫瘍の関連については不明な点が多いが、今後さらなる研究が期待される。