

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19173

研究課題名(和文)造血器腫瘍におけるオートタキシンの診断マーカーとしての意義

研究課題名(英文)The significance of autotaxin as a tumor marker in hematological malignancies

研究代表者

増田 亜希子(Masuda, Akiko)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70572717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)： リゾホスファチジン酸(LPA)は、細胞増殖、細胞運動性の亢進など多彩な作用を有するユニークな生理活性脂質である。オートタキシン(ATX)はLPAの産生を触媒する酵素である。以前の我々の研究では、濾胞性リンパ腫患者で血清ATX抗原量が高値であった。本研究の目的は、ATXの診断マーカーとしての意義を見出すことである。

本研究では、造血器腫瘍患者および健常者の末梢血を対象に、フローサイトメトリーを用いてATXの発現を比較した。数種類の抗体を用いて測定を行ったが、反応性が異なり、一定の傾向を見出すことが困難であった。ウェスタンブロットなど、他の手法でも解析を行う必要があると考えられた。

研究成果の概要(英文)： Autotaxin (ATX) is a tumour cell motility-stimulating factor originally isolated from melanoma cell supernatants. ATX is identical to lysophospholipase D, which produces a bioactive lipid mediator, lysophosphatidic acid (LPA), from lysophosphatidylcholine. We previously reported the clinical significance of serum ATX measurements. The serum ATX antigen levels in patients with B-cell neoplasms, especially with follicular lymphoma (FL), were higher than those in healthy subjects.

In the present study, we examined the surface expression of ATX in peripheral blood cells from healthy subjects and patients with hematological malignancies. Although we measured the expression of ATX using several antibodies, the expressions of ATX were variable.

研究分野：病態検査学

キーワード：オートタキシン リゾホスファチジン酸

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) リゾリン脂質とオートタキシン

代表的なリゾリン脂質メディエーターとして、リゾホスファチジン酸 (lysophosphatidic acid : LPA) とスフィンゴシン 1-リン酸 (sphingosine 1-phosphate : Sph-1-P) が知られている。LPA はグリセロリン脂質である一方、Sph-1-P はスフィンゴ脂質であり、異なるグループに属するが、同じリゾリン脂質として似た特性を有している。LPA と Sph-1-P は、*in vitro* で細胞増殖促進作用、細胞運動調節作用、抗アポトーシス作用など、類似した作用をもつとともに、細胞膜の特異的な 7 回膜貫通型の G 蛋白共役型受容体 (GPCR) を介して作用することが知られている。

LPA は *in vitro* で細胞増殖・運動性の促進、血小板の凝集、平滑筋細胞の収縮、腫瘍細胞の浸潤促進など、多彩な生理活性を示す。LPA はヒトの血清や血漿に存在し、主に産生酵素を介して産生される。オートタキシン (autotaxin : ATX) は、悪性腫瘍の浸潤や転移に関与する因子として、A2058 ヒトメラノーマ細胞培養上清から単離されたされた蛋白質である。リゾホスファチジルコリン (lysophosphatidylcholine : LPC) を基質として LPA の産生を触媒するリゾホスホリパーゼ D 活性を有する。ATX は Hodgkin リンパ腫や前立腺癌など様々な悪性腫瘍の組織で発現が亢進しており、LPA の産生を介して腫瘍の増殖・進展を促進していると考えられている。

一方、Sph-1-P は、細胞増殖の促進、抗アポトーシス作用、細胞分化誘導、細胞骨格・細胞運動調節、神経突起退縮など、多彩な生理活性を示す。加えて、*in vivo* では、Sph-1-P が創傷治癒、神経形成、血管形成に関与することが明らかになっている。Sph-1-P は、細胞内でスフィンゴシン (sphingosine : Sph) がスフィンゴシンキナーゼ (sphingosine kinase : SphK) によりリン酸化されて生じる。SphK には複数のサブタイプがあり、SphK1 と SphK2 が同定されている。

このように、リゾリン脂質は様々な病態に関与していると考えられるが、ヒトの病態下における LPA や Sph-1-P、ATX の変動については、ほとんど明らかにされていなかった。

### (2) 今までの検討内容

我々は、リゾリン脂質の (病態) 生理学的意義を明らかにするには、ヒトの体内における動態を探求する必要があると考え、診断的応用を目的とした研究に取り組んできた。我々は、共同開発した ATX の免疫学的測定法 (文献 1) を用いて、造血器腫瘍患者、特に濾胞性リンパ腫 (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、血清 ATX 抗原量が FL の病勢をよく反映し、有用なマーカーとなりうることを報告した。FL 患者の血清 ATX 抗原量は、既存の

リンパ腫マーカー (可溶性 IL-2 レセプター、LDH、CRP) に比べて炎症の影響が少なく、より特異的なマーカーと考えられた。FL 患者の血清 LPA 値は、血清 ATX 抗原量と有意に相関していた (文献 2)。これは、悪性腫瘍患者において血清 ATX が上昇することを示した最初の報告であった。フローサイトメトリー (FCM) では、FL 患者の末梢血腫瘍細胞で ATX が発現しており (文献 2)、ATX は FL 細胞により産生されていると考えられた。我々のグループでは、血清 ATX が妊娠高血圧症候群、肝臓の線維化やメタボリックシンドロームなど、様々な疾患のマーカーになりうることも示している。

一方、Hodgkin リンパ腫 (Hodgkin lymphoma : HL) の細胞株 KM-H2 を用いた検討では、KM-H2 は Sph-1-P の受容体 S1P1 を発現しており、Sph-1-P が HL の病態に関与している可能性が示唆された。Sph-1-P の受容体 S1P1 は、リンパ球の遊走に関与することが知られているため、ヒトの血球における解析は意義が大きい。

以上のように、リゾリン脂質とその関連物質のヒト検体を対象とした測定は、様々な疾患のマーカーとなりうると思われる。

## 2. 研究の目的

我々は、これまで、東京大学大学院医学系研究科・医学部倫理委員会の承認のもと、LPA、ATX、Sph-1-P の臨床検査医学的応用の観点で研究に取り組んできた。本研究では、今まで得られた知見をもとに、造血器腫瘍における ATX の診断マーカーとしての意義を中心に検討したい。

### (1) LPA、ATX 測定の診断的応用

我々は、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り、病勢をよく反映していることを報告している。FCM では、FL 患者の腫瘍細胞で ATX が発現しており、腫瘍細胞の産生によって ATX が高値になっていると推測された。また、FL 以外にも、様々な B 細胞性リンパ腫で血清 ATX 抗原量が高い傾向が確認された。

ATX は悪性リンパ腫のマーカーとして応用可能と考えられることから、本研究では悪性リンパ腫疑いの患者を対象とした前向き観察研究を計画し、血清 ATX 抗原量の診断マーカーとしての意義について検討したいと考えている。血清を検体とするバイオマーカーは採取が容易であるため、既存のマーカーを上回る有用性が得られた場合、医療現場におけるニーズはきわめて高い。

### (2) FCM による ATX 発現の解析

ATX と LPA は、臓器線維化、悪性腫瘍の発症・浸潤、生殖、血管新生など、多くの (病態) 生理機能との関連が示唆されている。

我々は、FL 患者の末梢血腫瘍細胞で ATX

が発現していることを報告している(文献2)。海外のグループから、Hodgkin リンパ腫患者の腫瘍組織で ATX が発現していることが報告されているが、我々の検討では、Hodgkin リンパ腫患者の血清 ATX は、健常者と比較して有意差を認めなかった。

我々の検討では、FL 患者の血清 ATX が高値であり、FL 細胞で ATX が発現していたことから、血清 ATX 高値の機序としては腫瘍からの ATX 産生が考えられる。ATX は分泌型のリゾホスホリパーゼ D であり、インテグリンを介して細胞膜に付着していると考えられていることから、FCM では細胞膜に付着した ATX を検出している可能性がある。

本研究では、造血器腫瘍細胞の ATX の発現の解析を行うことにより、ATX の診断マーカーとしての意義を検討するとともに、ATX 上昇の機序について解明したい。造血器腫瘍細胞における ATX の発現を解析し、ATX の細胞膜への結合形式が解明できれば、ATX の診断マーカーとしての応用や病態解明につながる。

### (3) Sph-1-P 受容体 S1P1 の解析

Hodgkin リンパ腫の細胞株 KM-H2 を対象とした検討では、Sph-1-P の受容体 S1P1 の発現が認められた。S1P1 は、リンパ球の遊走に關与することが知られているため、ヒトの血球(リンパ球など)における発現の解析は、病態解明の点でも意義が大きい。FCM により、S1P1 の発現について解析を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 悪性リンパ腫疑い(リンパ節腫大)患者を対象とした血清 ATX 測定(前向き観察研究)

当院を悪性リンパ腫疑いとして受診した患者のうち、リンパ節生検を行う患者 100 例(成人男女 50 例ずつ)を対象に前向き観察研究を行う。同意の得られた患者を対象に、検査後残血清を用いて血清 ATX 測定を行う。血清 ATX 値と診断との関連について検討を行う。ATX の受信者動作特性(ROC)曲線を作成し、既存のリンパ腫マーカー(可溶性 IL-2 レセプター、LDH、CRP)と診断能を比較する。ROC 曲線をもとにカットオフ値を設定する。

(2) FCM による ATX 発現の解析(造血器腫瘍患者検体を用いた実験)

造血器腫瘍患者の検査後残検体(末梢血、骨髓、組織)を対象に、FCM を用いて ATX 発現の解析を行う。対象は、骨髓または末梢血に腫瘍細胞が認められる造血器腫瘍患者(急性白血球病やリンパ腫)50 例である。疾患別に ATX の陽性率を比較し、診断マーカーとしての意義について検討する。

FCM は日常的に行われている検査であるため、有用な知見が得られれば、臨床応用可

能であると考えられる。

(3) Sph-1-P 受容体 S1P1 の FCM による解析  
以前に行った FCM による検討では、T リンパ球で S1P1 の発現が認められた(未発表データ)。以前使用していた抗体が製造中止となっているため、本研究では、別の抗体を用いて、S1P1 の発現について解析を行う。

## 4. 研究成果

(1) 悪性リンパ腫疑い(リンパ節腫大)患者を対象とした血清 ATX 測定

本研究実施を目的とした研究倫理申請等、準備を行っていたが、研究機関内に十分な体制を整えることが困難であった。

(2) FCM による ATX 発現の解析

健常者および造血器腫瘍患者の末梢血を対象に、FCM による測定を行った。

3 種類の抗体(モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体)を使用し、ATX の発現について解析を行ったが、抗体の種類により反応性が異なり、一定の傾向を見出すことが困難であった。

FCM だけでなく、ウェスタンブロットなど、他の手法でも解析を行う必要があると考えられた。

(3) Sph-1-P 受容体 S1P1 の FCM による解析  
健常者末梢血の検体を対象に、T リンパ球、B リンパ球、好中球など、血球の種類別に解析を行った。

以前使用していた抗体とは結果が異なり、ほぼすべての血球で陰性を示した。以前の結果の再現性も問題となるため、今回使用した以外の抗体を用いて再検を行い、さらに検討を行う必要があると考えられる。

## 引用文献

1) Nakamura K, Igarashi K, Ide K, et al. Validation of an autotaxin enzyme immunoassay in human serum samples and its application to hypoalbuminemia differentiation. Clin Chim Acta. 2008 Feb;388(1-2):51-8.

2) Masuda A, Nakamura K, Izutsu K, et al. Serum autotaxin measurement in haematological malignancies: a promising marker for follicular lymphoma. Br J Haematol. 2008 Oct;143(1):60-70.

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

増田 亜希子 (Masuda, Akiko )  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：70572717

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )