

卵巣癌患者における血漿リゾホスファチジン酸の異常

沖 田 美佐子

要旨 卵巣癌38例の血漿リゾホスファチジン酸(lysophosphatidic acid: LPA)濃度ならびにその分子種を分析し、健常対照11例と比較した。血漿総LPA濃度は卵巣癌例($1.59 \pm 0.23 \text{ nmol/ml}$)が健常対照例($0.36 \pm 0.09 \text{ nmol/ml}$)に比し有意の高値を示した。また、LPAの分子種では卵巣癌例において健常例で検出されなかったリノール酸(18:2n-6)-LPAやアラキドン酸(20:4n-6)-LPAが高頻度に検出された。血漿を37℃で24時間インキュベートしたときの総LPA生成量は、卵巣癌例(9例、 $44.2 \pm 6.4 \text{ nmol/ml}$)と健常対照例(6例、 $29.6 \pm 2.7 \text{ nmol/ml}$)の間に有意差を認めるには至らなかったものの、卵巣癌例の血漿ではパルミチン酸(16:0)-LPAの生成量が大で、パルミチン酸-LPA/リノール酸-LPAならびにアラキドン酸-LPA/リノール酸-LPAモル比が健常対照例より有意の高値を示し、血漿LPAの分析は脂質代謝異常や病態を把握する上で有用と考えられた。

キーワード：リゾホスファチジン酸、卵巣癌患者、血漿、腹水

はじめに

卵巣癌は脂肪摂取量との関連が示唆されている癌の1つであり¹⁾、わが国においては死亡率が人口10万につき5.6(平成4年)となお低率であるが、近年増加しつつあり²⁾、北米では女性の癌死の第4位を占めるものである。また、卵巣癌は早期発見が非常に困難なため、5年生存率が35%以下という予後の極めて不良の癌である³⁾。

卵巣癌では一般に腹水貯留がみられ、腹水中には卵巣癌増殖因子が存在し、それがリゾホスファチジン酸(lysophosphatidic acid; LPA: monoacylglycerol-3-phosphate)であろうと推測されている⁴⁾。LPAはグリセロ脂質合成の中間体としての意義とは別に、近年、ホルモン様あるいは増殖因子様活性を有する物質として関心が高まっている水に可溶のリン脂質である。しかし、その由来は明らかでなく、トロンビンで血小板を活性化すると放出されることが知られており^{5, 6)}、血漿中に存在するLPAの供給源とみられる。また、血清中に存在することから血液凝固に際して生成されと考えられている。

ここでは卵巣癌患者の血漿中LPA濃度とその分子

種の分析を行い、腹水中LPAや血漿リゾホスファチジルコリン(LPC)の分析と併せて、血漿LPAの異常な増加とその分子種の変化の意義について検討した。

対象および方法

1. 対象

卵巣癌症例は入院あるいは通院治療中の47例(28-80歳、平均58歳)で、比較対照は45-63歳(平均53歳)の健常女性11例である。

2. 方法

1) 分析試料

血液7mlをEDTAまたはヘパリン含有の真空採血管に採り、3,000rpmで15分間遠心分離して血漿を得た。腹水は入院中の8例について採取し、採取後は-80℃で保存、また血漿は-20℃以下で保存し、いずれも7日以内に分析に供した。

2) リン脂質分析

血漿ならびに腹水中総脂質の抽出はBligh and Dyer法⁷⁾で、LPAの抽出はDasら⁸⁾の方法を一部改変して行った。血漿あるいは腹水1mlに7.5mlのクロロ

ホルム・メタノール (1:2v/v) を加え 1 分間攪拌後 3,000rpm、5 分間遠心分離して蛋白を除いた。クロロホルム・メタノール層に 2.5ml のクロロホルムを加えて 1 分間攪拌、さらに水 3.5ml を加えて 10 秒間攪拌後 3,000rpm で 15 分遠心分離し、下層を他の試験管に移した (抽出液 1)。残りに 5 ml のクロロホルムと 126 μ l の濃塩酸を加えて 1 分間攪拌、3,000rpm、15 分間遠心分離後クロロホルム層 (抽出液 2) をとり、それぞれの抽出液を窒素気流下に濃縮した。攪拌にはボルテクサー (Glas-Col, Terre Haute) を用いた。LPA は抽出液 2、その他のリン脂質は抽出液 1 と 2 について、Thomas らの方法⁹⁾に従い、二次元薄層クロマトグラフィーで分離した。各リン脂質に相当するスポットをかきとり、5 μ l のヘプタデカン酸を内部標準として加え、2 ml の塩化アセチル・メタノール液とともに 85℃、2 時間メチル化した。メチル化後石油エーテル 2 ml と水 1 ml を加えて 2,500rpm で 3 分間遠心分離、石油エーテル層をとり窒素気流下に乾固させ、二硫化炭素に溶解してその一部をガスクロマトグラフィー (島津 GC-14A、京都) による脂肪酸分析に供した。各脂肪酸濃度からリン脂質濃度を算出した。結果は平均 \pm SE で示し、統計学的処理には Kolmogorov-Smirnov ならびに Spearman R 検定を用いた。

結 果

1. 血漿ならびに腹水中の LPA 濃度

EDTA 採血した血漿中の総 LPA 濃度を図 1 に示した。血漿総 LPA 濃度は卵巣癌例 (1.59 ± 0.23 nmol/ml) で健常対照例 (0.36 ± 0.09 nmol/ml) に比し有意の高値を示し、分子種のうちパルミチン酸 (16:0)-LPA ($p < 0.01$) とステアリン酸 (18:0)-LPA ($p < 0.05$) では卵巣癌例が対照例に比し有意の高値を示した。さらに、健常例ではリノール酸 (18:2n-6)-LPA やアラキドン酸 (20:4n-6)-LPA を検出しなかったが、卵巣癌例では 58.3% の症例でリノール酸-LPA を、27.8% でアラキドン酸-LPA を認めた。

卵巣癌 8 例の腹水中 LPA 濃度とその分子種組成を図 2 に示した。総 LPA 濃度は血漿濃度の 2.15 倍の高値で、分子種ではパルミチン酸-LPA が 43.1% を占めたが、リノール酸-LPA とアラキドン酸-LPA も全症例に認められ、それぞれ 17.0、8.5% 存在した。

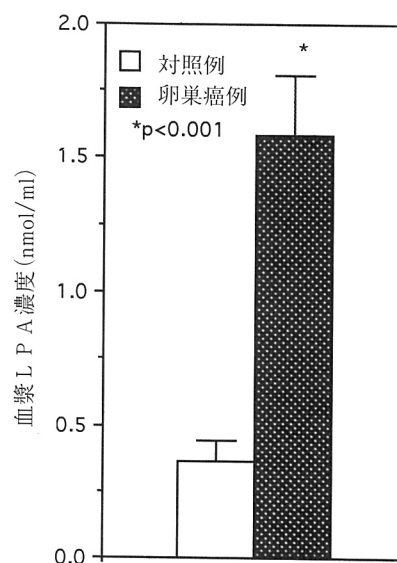


図1 健常対照11例と卵巣癌38例におけるEDTA採血血漿中LPA濃度 ($M \pm SE$)。

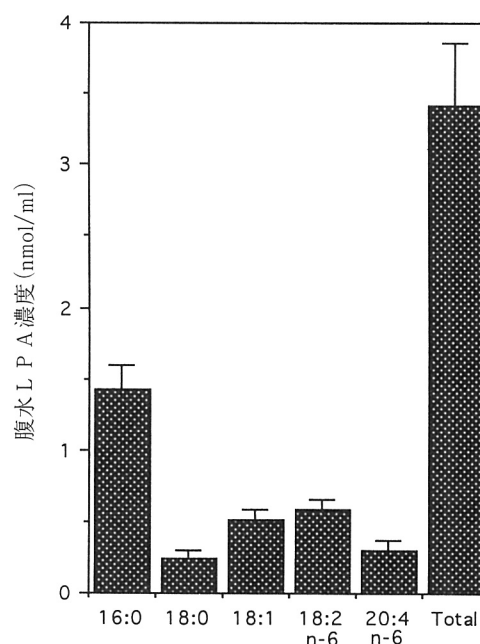


図2 卵巣癌8例の腹水中LPA濃度 ($M \pm SE$)。

16:0; パルミチン酸-LPA、18:0; ステアリン酸-LPA、18:1; オレイン酸-LPA、18:2n-6; リノール酸-LPA、20:4n-6; アラキドン酸-LPA

2. 血漿におけるLPA生成

ヘパリン採血した健常人の血漿を 37℃ で 48 時間までインキュベートしたときの LPA 生成量を示したのが図 3 である。リノール酸-LPA とアラキドン酸-LPA が 30 時間後には最高値に達したのに対し、パルミチン酸-LPA はこれらにやや遅れて増加し、35-45 時間の間に最高値に達した。

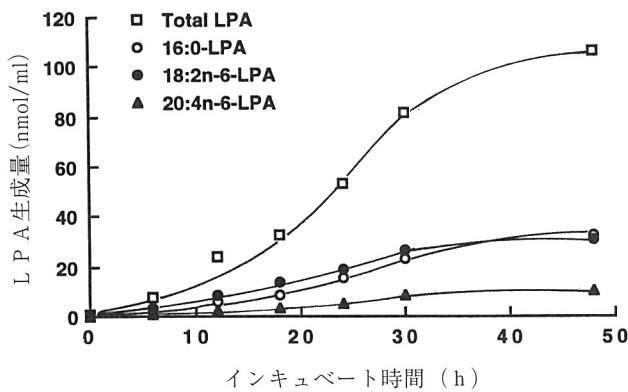


図3 健常対照例のヘパリン採血血漿を37℃でインキュベートしたときのLPA生成量。

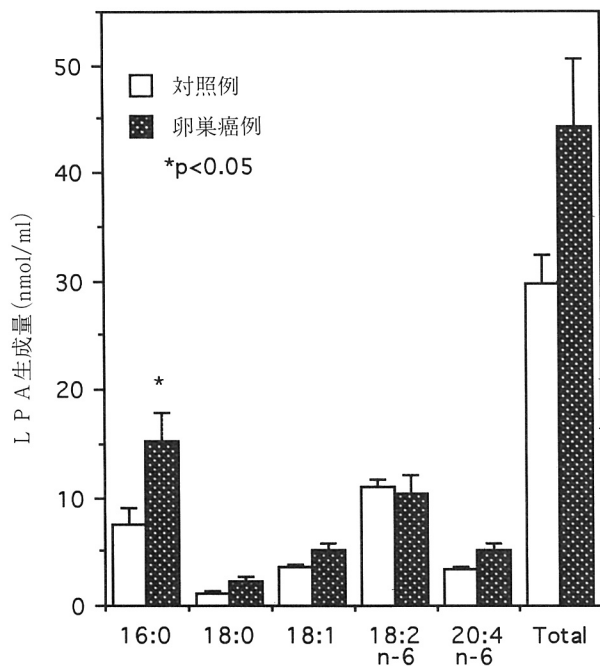


図4 健常対照6例と卵巣癌9例のヘパリン採血血漿を37℃、24時間インキュベートにより生成したLPA量 (M±SE)。

健常対照6例と卵巣癌9例のヘパリン採血血漿を24時間インキュベートして生成されたLPA量とその分子種を示したのが図4である。血漿総LPA生成量は卵巣癌例で高値を示す例がみられたものの卵巣癌例 (44.2 ± 6.4 nmol/ml) と対照例 (29.6 ± 2.7 nmol/ml) 間に有意差を認めるまでには至らなかった。しかし、卵巣癌例ではパルミチン酸-LPAが対照例に比べ有意 (p<0.05) の高値を示すとともにアラキドン酸-LPAにも高値例が多かったのに対し、リノール酸-LPAのみは対照例を下まわるといった特徴がみられた。

24時間インキュベート中に生成した血漿LPAのうちパルミチン酸-LPA/リノール酸-LPAならびにア

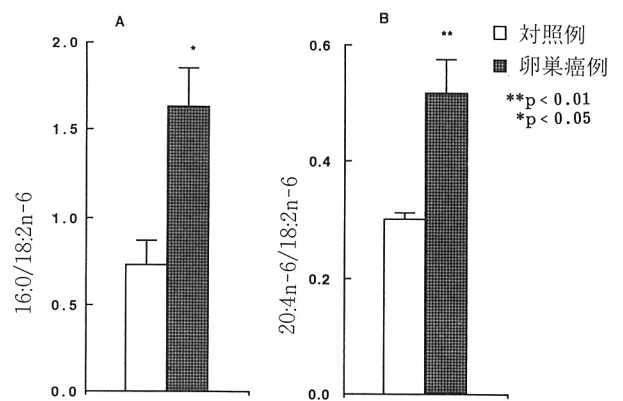


図5 健常対照6例と卵巣癌9例におけるヘパリン採血血漿を37℃、24時間インキュベートにより生成したLPAのうちパルミチン酸-LPAとリノール酸-LPA (16:0/18:2n-6) (A) およびアラキドン酸-LPAとリノール酸-LPA (20:4n-6/18:2n-6) (B) モル比の比較 (M±SE)。

ラキドン酸-LPA/リノール酸-LPAモル比を算出すると (図5)、卵巣癌例ではそれぞれ1.53 ± 0.60、0.52 ± 0.17となり、これらは対照例で得られた比 (0.68 ± 0.27、0.30 ± 0.03) よりいずれも有意の高値 (p<0.05、p<0.01) であった。とくにアラキドン酸-LPA/リノール酸-LPAモル比は卵巣癌例 (0.38-0.71) では全例で対照例 (0.25-0.34) より高値であるとともに腹水におけるその比 (0.55 ± 0.11) とほぼ一致した。

3. 血漿中のLPAとLPC濃度の相関

健常対照5例と卵巣癌15例における血漿LPA濃度とLPC濃度の関連性を示したのが図6である。卵巣癌例における血漿LPA濃度はLPC濃度と有意の正相関 (r=0.732、p<0.002) を示した。LPA濃度とホスファチジルコリン濃度の間に相関はみられなかった。

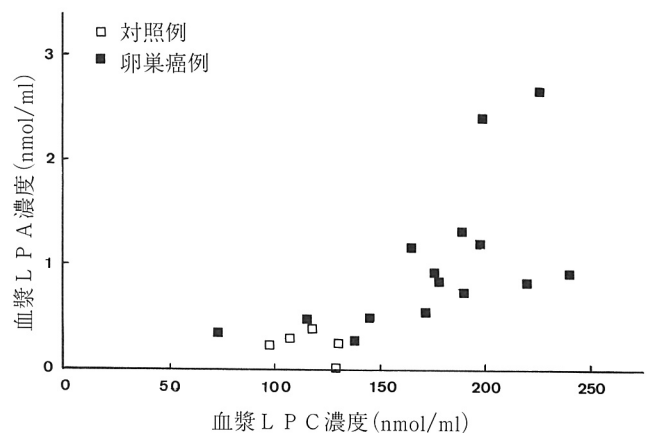


図6 対照5例と卵巣癌15例におけるEDTA採血血漿中リゾホスファチジルコリン (LPC) とLPA濃度の関連。卵巣癌例における相関係数r=0.732 (p<0.002)。

考 察

卵巣癌患者の血漿LPA濃度を分析した結果、健常対照例に比し高値を示すことを認めるとともに、多価不飽和脂肪酸を含有するLPAの存在を明らかにした。さらに、卵巣癌患者の血漿をインキュベートして産成されるLPAはパルミチン酸に富みリノール酸の乏しいものであることが認められた。

ヒト血漿LPA濃度に関する報告はないが、EDTA採血して得られた今回の健常対照例における血漿LPA濃度は、これまで血清について報告されている濃度(1-5 μM)⁹⁾より明らかに低値であり、LPAが血液凝固の過程で生成されるということを支持するものである。

卵巣癌腹水中に存在するLPAは癌細胞に由来するとの推論もあるがいまだ確認には至っていない。腹水中のLPA分子種組成は血漿をインキュベートして生成されたLPAの分子種組成に近似しており、その関連性を示唆している。

ヒト卵巣癌から分離したマクロファージは多量のインターロイキン-6(IL-6)を産生し¹⁰⁾、しかも卵巣癌腹水中のIL-6は血清におけるよりも強い生理活性を示すとともに、循環血中血小板数との間に高い相関を有する¹¹⁾。さらに、卵巣癌例の56%に血小板増加がみられ¹²⁾、血小板増加が腹水貯留量と有意の相関を示すという報告¹³⁾がある。今回の対象の血小板数は不明であるが、卵巣癌例で観察された血漿中LPA濃度の上昇が血小板増加に基づくものとも推測できる。

LPAはその大部分がホスホリパーゼ(phospholipase) A₂ (PLA₂)の作用で、ホスファチジン酸(phosphatidic acid: PA)から産生されるとされ、上皮増殖因子をはじめ多くの成長因子やホルボレステルがPLA₂の活性を高め、生理活性物質の前駆物質であるアラキドン酸の放出を促進させるが、LPAそれ自身もPLA₂を活性化する¹⁴⁾。卵巣癌例におけるパルミチン酸-LPAの著明な増加は、LPA₂活性の上昇に伴って起こったPAからのアラキドン酸放出の増加を意味するのかもしれない。

PLA₁もまたPAを加水分解し、sn-2-アシル-LPAを生成し、生成されたsn-2位置の脂肪酸の一部は速やかにsn-1の位置に転移する¹⁵⁾。24時間インキュベート血漿中に存在したリノール酸やアラキ

ドン酸など多価不飽和脂肪酸を有するLPAはPLA₁によって生成されたものと推測される。細胞内PLA₁については情報伝達への関わりも不明であるが、sn-2-多価不飽和脂肪酸-LPAが $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を増加させる作用が最も強いことから、LPA生成におけるPLA₁の意義は大きいと考えられる。

LPAの主要な前駆物質であるPAはPCやホスファチジルエタノールアミン(PE)にホスホリパーゼD(PLD)が働くか、PCやホスファチジルイノシトール(PI)にホスホリパーゼC(PLC)が作用してジアシルグリセロール(diacylglycerol: DAG)を生成し、DAGがDAGキナーゼでリン酸化されることにより産生される。LPAはPLDを活性化し、PCを速やかに分解することも知られている¹⁶⁾。

LPA生成にリゾホスホリパーゼD(LPLD)が関与するのではないかと示唆もある¹⁷⁾。LPLDは多価不飽和脂肪酸を有するリゾホスファチジルコリン(LPC)を優先的に加水分解するため、図3に示したように、血漿をインキュベートすると多価不飽和脂肪酸をもつLPAが飽和脂肪酸分子種に先んじて増加したとも推測される。さらに、図6にみられるように血漿LPA濃度が血漿LPC濃度と正相関を示したことは、LPAがLPLDの作用で生成されることを示唆するものとも受けとめられる。しかし、LPLDについてはその存在を証明する報告は見あたらない。

LPAは増殖因子様作用、 Ca^{2+} イオノフォア作用など多様な生理活性を示す物質であり、細胞増殖の制御因子としての役割を有すると推測される¹⁸⁾。最近の報告では、多価不飽和脂肪酸を有するLPAは飽和脂肪酸を有するものより生理活性が強いこと¹⁹⁾が認められており、卵巣癌例の血漿中にリノール酸-LPAやアラキドン酸-LPAが高頻度に検出されたことは癌増殖へのLPAの関与を窺わせるものである。最近、LPAの受容体に関する報告がいくつかみられ^{20, 21)}、受容体が明らかとなればLPAの作用機序も一層明確となるであろう。

血漿で生成されるLPAのパルミチン酸-LPA/リノール酸-LPAおよびアラキドン酸-LPA/リノール酸-LPAモル比の異常な高値は、血小板膜の脂肪酸組成の変化もその一因と考えられるが、リノール酸からアラキドン酸への代謝亢進も示唆される。LPAの供給源となるPCやPEなどの脂肪酸組成は摂取する食品の脂肪酸組成を反映するものであり、脂質栄

養のコントロールによってLPA分子種を変化させ、その機能に影響をおよぼすことも可能と考えられる。また、卵巣癌の鋭敏なマーカーが乏しい現状において、血漿LPAの分析は病態の把握と治療効果の判定などに有用と推測される。

付記

本研究はDepartment of Nutritional Sciences, University of Guelph (カナダ、オンタリオ州) において行ったものである。研究にあたり多大なご協力、ご支援を戴きましたBruce J. Holub教授ならびに関係各位に深く感謝いたします。

文献

1. Miller, A. B., Hill, B. M., Pietinen, P., Riboli, E., and Wahrendorf, J. (1994). Diet in the aetiology of cancer: A review. *Eur. J. Cancer*, 30A: 207-220
2. 厚生統計協会 (1994)、国民衛生の動向、41 (9) , p.422. 厚生統計協会.
3. Carlson, K. J., Skates, S. J., and Singer, D. (1994). Screening for ovarian cancer. *Ann. Intern. Med.*, 121:124-132
4. Mills, G. B., May, C., Hill, Campbell, S., Shaw, P., and Marks, A. (1990). Ascitic fluid from human ovarian cancer patients contains growth factors necessary for intraperitoneal growth of human ovarian adenocarcinoma. *J. Clin. Invest.*, 86: 851-855.
5. Gerrard, J. M., and Robinson, P. (1989). Identification of the molecular species of lysophosphatidic acid produced when platelets are stimulated by thrombin. *Biochim. Biophys. Acta*, 1001: 282-285.
6. Eichholtz, T., Jalink K., Fahrenfort, I., and Moolenaar, W. H. (1993). The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets. *Biochem. J.*, 291:677-680
7. Bligh, E. G., and Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37: 911-917.
8. Das, A. K., and Hajre, A. K., (1989). Quantification, characterization and fatty acid composition of lysophosphatidic acid in different rat tissues. *Lipids*, 24:329-333.
9. Thomas, L. M., and Holub, B. J. (1991). Eicosanoid-dependent and -independent formation of indi-

- vidual [¹⁴C] stearoyl-labelled lysophospholipids in collagen-stimulated human platelets. *Biochim. Biophys. Acta*, 1081: 92-98.
10. Erroi, A., Sironi, M., Chiaffarino, F., Zhen-Guo, C., Mengozzi, M., and Mantovani, A. (1989). IL-1 and IL-6 release by tumor-associated macrophages from human ovarian carcinoma. *Int. J. Cancer*, 44: 795-801.
11. Gastl, G., Plante, M., Finstad, C. L., Wong, G. Y., Federici, M. G., Bander, N. H., and Rubin, S. C. (1993). High IL-6 levels in ascitic fluid correlate with reactive thrombocytosis in patients with epithelial ovarian cancer. *Br. J. Haematol.*, 83: 433-441.
12. Chalas, E., Welshinger, M., Engellener, W., Chumas, J., Barbieri, R., and Mann, W. J. (1992). The clinical significance of thrombocytosis in women presenting with a pelvic mass. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 166: 974-977.
13. Zeimet, A. G., Christian, M., Müller-Holzner, E., Daxenbichler, G., and Dapunt, O. (1994). Significance of thrombocytosis in patients with epithelial ovarian cancer. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 170: 549-554.
14. Exton, J. H. (1994). Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. *Biochim. Biophys. Acta*, 1212:26-42.
15. Entressangles, B., Sari, H., and Desnuelle, P. (1966). On the positional specificity of pancreatic lipase. *Biochim. Biophys. Acta*, 125: 597-600.
16. van der Bend, R. L., de Widt, J., van Corven, E. J., Moolenaar, W. H., and van Blitterswijk, W. J. (1992). The biologically active phospholipid, lysophosphatidic acid, induces phosphatidylcholine breakdown in fibroblasts via activation of phospholipase D. *Biochem. J.*, 285: 235-240.
17. Tokumura, A., Harada, K., Fukuzawa, K., and Tsukatani, H. (1986). Involvement of lysophospholipase D in the production of lysophosphatidic acid in rat plasma. *Biochim. Biophys. Acta*, 875: 31-38.
18. Tigyi, G., Dyer, D. L., and Milei, R. (1994). Lysophosphatidic acid possesses dual action in cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:1908-1912.
19. Tokumura, A., Yube, N., Fujimoto, H., and Tsukatani, H. (1991). Lysophosphatidic acids induce contraction of rat isolated colon by two different mechanisms. *J. Pharm. Pharmacol.*, 43: 774-778.
20. van der Bend, R. L., Brunner, J., Jalink, K., van Cor-

- ven, E. J., Moolenaar, W. H., and van Blitterswijk, W. J.
(1992). Identification of a putative membrane receptor for
the bioactive phospholipid, lysophosphatidic acid *EMBO*
J., 11: 2495-2501.
21. Thomson, F. J., Perkins, L., Ahern, D., and Clark, M.
(1994). Identification and characterization of a lysophos-
phatidic acid receptor. *Mol. Pharmacol.*, 45:718-723.

Abnormal plasma lysophosphatidic acid level in ovarian cancer patients

Misako Okita

Department of Nutritional Science, Faculty of Health and Welfare Science,
Okayama Prefectural University
111 Kuboki, Soja-shi, Okayama Prefecture, Japan 719-11

Key words : lysophosphatidic acid, ovarian cancer patients, plasma, ascites