

第16回 春季大会記録

シンポジウム：臨床検査医学の進歩

2. 生理活性脂質と臨床検査

東京大学医学部附属病院

矢 富 裕, 大 川 龍之介, 中 村 和 宏, 池 田 均

はじめに

いわゆる生理活性脂質は、細胞が刺激を受けた際に、情報伝達酵素の活性化を介して生体膜の構造脂質であるリン脂質から産生・放出される。当然ながら、蛋白質・ペプチド性のメディエーターのようにそれ自身が遺伝子にコードされておらず、その合成と分解に関与する酵素でその量が調節される。また、ほとんどの生理活性脂質は、標的細胞上に発現する細胞膜7回貫通型のG蛋白質共役受容体に作用することにより、細胞応答を惹起する。プロスタグランジン、ロイコトリエン、血小板活性化因子などが代表的生理活性脂質である。

我々は、ここ10年、新規生理活性脂質の一つとして多大な注目を浴びているスフィンゴシン1-リン酸(sphingosine 1-phosphate; Sph-1-P)<sup>1)2)</sup>さらにはリゾホスファチジン酸(lysophosphatidic acid; LPA)<sup>3)</sup>というリゾリン脂質性メディエーター(図1)に注目している。リゾリン脂質とは、リン脂質の2本のアシル基のうち1本を失ったものであり、その物理化学的性質から膜の脂質二重層に容易に刺入し、高濃度下ではその界面活性作用により細胞膜を傷害する。しかし、一方では、通常の2本のアシル基を有するジアシル型リン脂質と異なり、リゾリン脂質は容易に膜間移動することが可能であり、シグナル分子として機能しうる。Sph-1-PやLPAは、新しいクラスの脂質性メディエーターとして注目され、プロスタグランジン類と同様に特異的受容体を介して、血管生物学、免疫学、さらには脳神経領域などにおいて多彩な細胞応答を示すことが示されている。本項では、臨

床検査医学的応用を念頭においた、我々のリゾリン脂質性メディエーター研究の現況を紹介する。

1. 血漿(血清)構成員としてのSph-1-P<sup>2)4)</sup>

Sph-1-Pを論じる上で、血小板は最も重要な細胞の一つである。血小板におけるスフィンゴ脂質代謝は特異なものであり、非常に高い(Sph-1-P産生を担う)Sphキナーゼ活性を有する一方、Sph-1-Pを分解する酵素であるSph-1-Pリアーゼ(開裂酵素)の活性を例外的に欠く。産生酵素活性が高く、代謝酵素活性を欠くことから予想される血小板におけるSph-1-Pの豊富な蓄積は実際の定量により示されている。さらに重要なことに、血

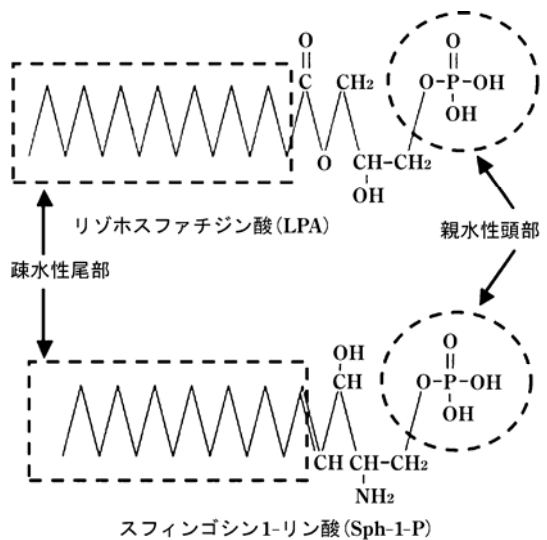


図1 リゾリン脂質性メディエーター  
リゾホスファチジン酸(LPA)(上段)とスフィンゴシン1-リン酸(Sph-1-P)(下段)の構造式を示す。ともに、親水性の頭部(リン酸基)と疎水性の尾部を有する。

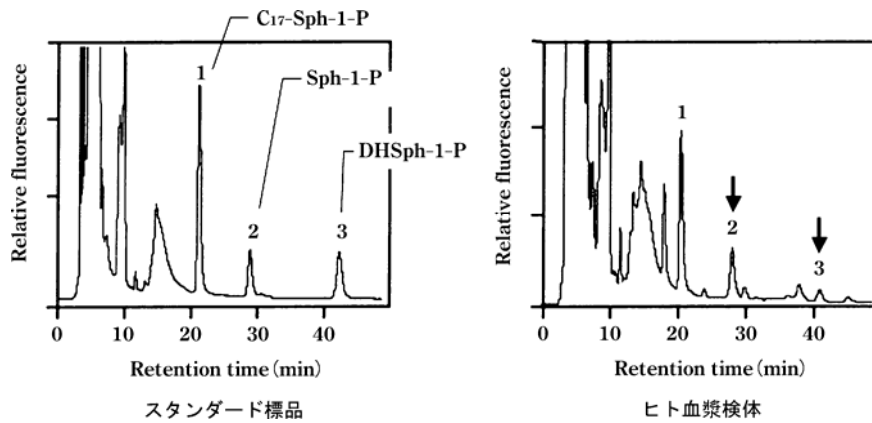


図2 Sph-1-P 測定法

o-フタルアルデヒドで誘導体化後、HPLCで分離し、蛍光モニターで測定する。本クロマトではC<sub>17</sub>-Sph-1-P(1)を内部標準として用いている。Sph-1-P(2)とともに、関連脂質であるジヒドロ Sph-1-P(3)も血漿中に検出される。

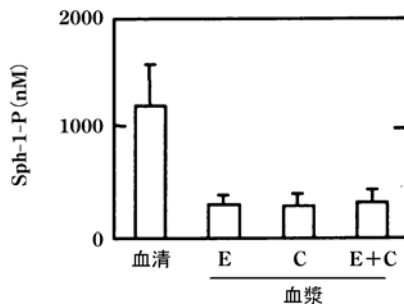


図3 血漿・血清における Sph-1-P の測定

健康人の EDTA 血漿 (E), CTAD 血漿 (C), EDTA+CTAD 血漿 (E+C), さらには血清における Sph-1-P を定量した。

血小板に貯蔵されている Sph-1-P はその活性化に伴って細胞外へ放出される。活性化血小板から Sph-1-P が放出されることより、当然ながら Sph-1-P は血漿・血清において検出される(図2)。最近のデータでは、血漿 Sph-1-P 濃度は約 200nM、血清 Sph-1-P 濃度は約 1 $\mu$ M である(図3)。血清と血漿の Sph-1-P レベルの差は、当然、活性化血小板からの放出を反映したものであり、血中における Sph-1-P 産生源としての血小板の重要性を示すものと考えられる。

以前は、アルブミンが血漿中における Sph-1-P のキャリアーであると想定されていたが、近年、HDL, LDL などのリポ蛋白質(特に前者)もその結合蛋白となりうること、さらには、HDL に結

合している Sph-1-P が、HDL の抗動脈硬化作用の少なくともいくつかを担っているという大変重要な知見が明らかになっている(後述)。また、血漿では Sph-1-P は代謝的に安定であるが、血管内皮細胞、血管平滑筋、血球の表面には、エクト酵素としての lipid phosphate phosphatase が発現しており、Sph-1-P を脱リン酸化することが明らかとなっている。血漿における Sph-1-P の動態は、ダイナミックに制御されていることが想定される。活性化血小板由来 Sph-1-P は、その受容体である S1P<sub>1-5</sub>(以前の EDG ファミリー)を発現している細胞に作用して種々の血管生物学的役割を果たしていると考えられるが以下にその一端を示す。

## 2. Sph-1-P の血管生物学的作用<sup>5)</sup>

血小板には、Sph-1-P に対する受容体が発現しており、実際、Sph-1-P は血小板を活性化する。当初、Sph-1-P がオートクリン的に血小板活性化を増幅すべく作用し、血栓・止血反応に関与する可能性を想定していたが、血小板活性化には $\mu$ M レベルの高濃度の Sph-1-P を要し、血漿・血清の Sph-1-P レベルを考慮すると、その生理的意義は疑問視される。現時点では、Sph-1-P との関連では、血小板はその貯蔵庫として最も重要な存在意義を有すると考えている。

血管内皮細胞は S1P<sub>1</sub> を豊富に発現し、Sph-1-P

に対して劇的な反応を示す。Sph-1-P は細胞増殖促進作用を示すとともに、増殖因子除去によるアポトーシスを回避する。これらの作用は百日咳毒素感受性であり、S1P<sub>1,3</sub>(主に前者)を介すると考えられている。さらには、HDL に結合している Sph-1-P が内皮細胞保護作用を示し、このことが HDL の内皮細胞保護作用さらには抗動脈硬化作用を説明するという興味深い報告がなされている。また、Sph-1-P は、血管内皮細胞に対して劇的な細胞骨格再編成を惹起し、きわめて強い遊走反応を惹起することが示されている。この際もやはり、内皮細胞が発現する S1P<sub>1,3</sub> を介する経路の相乗作用が重要と考えられている。その強力な血管内皮細胞の増殖・遊走促進作用から予想されるように、Sph-1-P は血管新生(増強)因子として作用することも、*in vitro* ならびに *in vivo* のアッセイで確認されている。さらには、Sph-1-P による血管内皮細胞バリア機能発現、血管統合性の維持さらには新生血管の安定化、NO 産生が知られている。以上のような血管保護的な作用とは対照的に、Sph-1-P の向動脈硬化・向血栓性作用も報告されているが、これには概して高濃度の Sph-1-P を必要とする。

Sph-1-P は、細胞遊走に関し、促進・抑制両作用を呈することが以前から知られていたが、これは、細胞特異的に発現している Sph-1-P 受容体(S1P)の差違で説明されることがわかってきた。つまり、S1P<sub>1</sub> は遊走促進的に、S1P<sub>2</sub> は遊走抑制的に作用する。血管平滑筋細胞は、S1P<sub>1</sub> を主に発現する血管内皮細胞と異なり、Sph-1-P により細胞遊走が抑制されることが以前より知られていたが、これは、細胞遊走を抑制する S1P<sub>2</sub> の発現によることが判明している。また、S1P<sub>2</sub> を介する平滑筋の収縮反応も明らかにされており、血管トーンスの保持・増強における Sph-1-P の重要性が想定されている。

上記のように、血管系における Sph-1-P/S1P シグナリングの重要性が示唆されていたが、S1P<sub>1</sub> のノックアウトマウスは、胎生 12.5~14.5 日の間に、出血により子宮内で死亡することが報告され

た。Sph-1-P とその受容体の血管生物学における重要性を個体レベルで示したものとして注目され、さらなる研究の進歩が待たれる。

### 3. Sph-1-P の他の細胞・組織における重要性：血小板の多機能性と絡めて

生理的止血、病的血栓への関与にとどまらない血小板の多機能性が明らかとなりつつあるが、活性化血小板から放出される Sph-1-P がこれに関与する可能性も十分ありうると思われる。慢性肝疾患の進展・肝線維化、腎メサンギウム細胞の増殖さらには糸球体腎炎の発症における活性化血小板の関与は以前より論議されているが、これらに Sph-1-P が関与する可能性も想定されている。また、今後、Sph-1-P 作用制御による治療医学的応用は益々盛んになると予想される。とくに S1P 受容体作動薬は、創薬の非常に重要なターゲットと考えられる。

### 4. Sph-1-P 定量の検査医学的応用<sup>4)</sup>

我々は、Sph-1-P の血管生物学的重要性に鑑み、血中とくに血漿における測定が重要と考え、その定量測定法を考案した。まず、Sph-1-P の物理化学的特性を生かした独特の抽出法を開発した。つまり、Sph-1-P がアルカリ性の下では水溶性が増すことから、フォルチの抽出を応用して、有機層に溶解している他の脂質から分離した後に、酸性下で Sph-1-P を有機層に戻し抽出するという方法である。そして、試料より抽出したこの Sph-1-P を、<sup>3</sup>H 標識無水酢酸で N-アセチル化することにより(これにより、<sup>3</sup>H 標識 C<sub>2</sub>-セラミド 1-リン酸が生成される)、定量測定する方法である。この方法で血小板 Sph-1-P 含量を測定したところ、10<sup>9</sup> 個の血小板あたり約 1.4nmol であったが、この値は、血小板 Sph 含量の約 4 倍であり、リン脂質含量で補正したところ、血小板の Sph-1-P 含量は、好中球・赤血球のその十倍以上であった。このように、血小板の特異なスフィンゴ脂質代謝経路から予想される血小板における Sph-1-P の豊富な存在が実証された。Sph-1-P 測定法として現

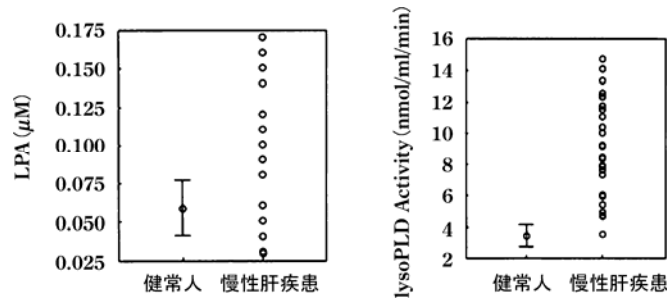


図4 健常人・慢性肝疾患患者の血漿 LPA 濃度(左)と血清 lysoPLD 活性(右)

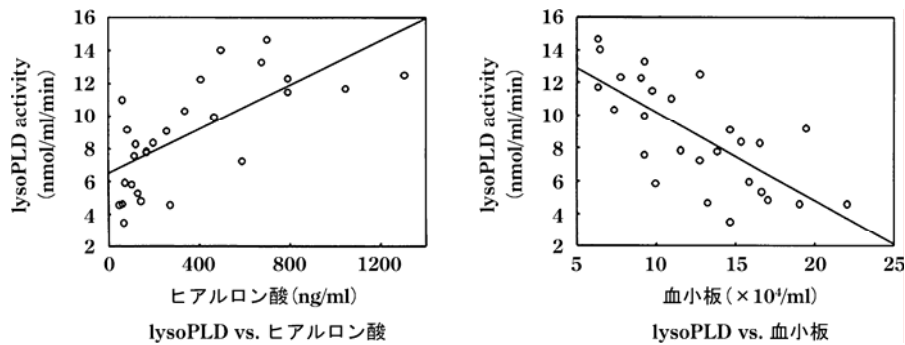


図5 肝疾患患者における血清 lysoPLD 活性とヒアルロン酸(左)と血小板数(右)との相関

時点で最も実用的であるのは OPA プレカラム誘導体化・HPLC 法と考えている(図2)。この方法により、血漿・血清 Sph-1-P の基準値も確定でき、現在、種々の臨床検体の測定を行っている。

## 5. LPA, lysoPLD 測定の臨床応用

一方、Sph-1-P が属するスフィンゴ脂質とは違うグループであるグリセリン脂質に属する LPA も、構造的には Sph-1-P 同様リズリン脂質であり、血清由来の脂質性増殖因子として、むしろ Sph-1-P よりも以前からその生体における機能の重要性が論じられていた。この両者は、作用もオーバーラップしており、受容体も同じファミリーに属している。長らく、LPA の血中における産生源としてやはり血小板が重要とされていたが、我々はこれに疑問を持ち、現在では、血漿の lyso-phospholipase D (lysoPLD) が血中 LPA 産生を律していることが明らかとなっている。さらには、この lysoPLD がクローニングされたところ、癌細胞運動性促進因子として以前より知られていたオートタキシンと同一であること、オートタキシン

は LPA 産生を介してこの作用を発揮することが判明し多大な注目を浴びている<sup>3)</sup>。

血漿中には、lysoPLD とその基質であるホスファチジルコリンが共存しており、血漿を 37°C または室温でインキュベーションするだけで、LPA レベルは上昇し続ける。したがって、血漿 LPA 測定のための検体採取の困難さが容易に想定できるが、我々は、基礎検討を重ね、最適血漿採取条件を決定できた。そして、最近、慢性肝疾患・肝線維化に伴って血漿 LPA が上昇し、有用な新規マーカーになりうる可能性を報告している(図4)<sup>6)</sup>。また、血清 lysoPLD 活性は、血漿 LPA 値と良い相関を有することが明らかになり、lysoPLD も慢性肝疾患・肝線維化のより測定簡便な新規マーカーになりうると想定している(図4, 5)<sup>6)</sup>。

## 6. おわりに

まだまだ、未知の部分が多いが、リズリン脂質性メディエーターに関する研究は、治療医学・診断医学両面でその応用が期待される。今後の研究の発展が期待される。

文 献

- 1) 木原章雄. 多彩な機能を持つスフィンゴ脂質, スフィンゴシン(長鎖塩基)1-リン酸の生理的役割, 生成/代謝, 細胞動態. 生化学 2006; 78: 725-37.
- 2) 矢富 裕. スフィンゴシン 1-リン酸: 血小板由来リゾリン脂質性メディエーター. 医学のあゆみ 2004; 208: 198-202.
- 3) 青木淳賢. リゾホスファチジン酸 (LPA) の産生機構. 生化学 2003; 75: 609-13.
- 4) 大川龍之介, 矢富 裕. スフィンゴシン 1-リン酸. 血栓と循環 2004; 12: 498-502.
- 5) 矢富 裕, 大森 司, 長田 誠, 尾崎由基男. スフィンゴシン 1-リン酸と血管内皮細胞. 編集 五十嵐靖之, 平林義雄, 小堤保則, 鈴木明身, 「蛋白質 核酸 酵素」増刊号「マイクロドメイン形成と細胞のシグナリング」. 東京: 共立出版; 2002. p.488-95.
- 6) Watanabe N, Ikeda H, Nakamura K, Ohkawa R, et al. Both plasma lysophosphatidic acid and serum autotaxin levels are increased in chronic hepatitis C. J Clin Gastroenterol (印刷中).