

AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

産婦人科の実際 (1990.12) 39巻13号:2035～2040.

卵巣癌とマンガン,スーパーオキシドジスムターゼ(Mn-SOD)

石川睦男、中田俊之、木村広幸、高岡康男、斉藤聡、清水
哲也

卵巣癌とマンガ、スーパーオキサイド ジスムターゼ (Mn-SOD)

石川 陸男* 中田 俊之* 木村 広幸*
高岡 康男* 齊藤 聡* 清水 哲也*

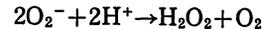
はじめに

われわれの体を構成する原子や分子が、不対電子を持つ際にフリーラジカルと総称する。このフリーラジカルは、他の物質より電子を奪うか、不対電子を与えることにより、安定化しようとするため反応性が高く、生体の障害や生体反応のメディエーターとしての役割を有する。一方、活性酸素とは、基底状態にある酸素分子($^{\circ}\text{O}_2$)以外の活性に富む酸素種の総称で、その主なものはスーパーオキサイド(O_2^-)、1種項酸素($^1\text{O}_2$)、ヒドロキシルラジカル(OH)などがある。最近フリーラジカル、活性酸素が、微小循環などの組織障害、老化、発癌など医学の各分野で注目を集めてきている。

とくにフリーラジカルや活性酸素と癌化との関連性は間接的証拠はいろいろ報告されてきたが、その分子機構はいまだ不明である。現在までのところ、この活性酸素および付随して生成される脂質酸化物などによる細胞障害、さらに、DNA障害による8-ヒドロキシングアニン生成などが、発癌過程に関与していると報告されている。さらに、活性酸素が癌化のプロモーター作用を有しているという考え方もある¹⁾²⁾。

* Mutsuo ISHIKAWA (助教授), Toshiyuki NAKATA, Hiroyuki KIMURA, Yasuo TAKAOKA, Satoshi SAITO, Tetsuya SHIMIZU (教授) 旭川医科大学産婦人科学教室
[別冊請求先] 〒078 旭川市西神楽4線5号3-11
旭川医科大学産婦人科学教室

さて生体内においてフリーラジカル、とくに O_2^- を消去する酵素がスーパーオキサイド、ジスムターゼ (superoxide dismutase, SOD) で、哺乳類では3種類知られており³⁾⁴⁾⁵⁾、Cu, Zn-SODは細胞質に、manganese SOD (Mn-SOD)はミトコンドリアに、Extracellular SODは細胞外に存在し、その反応は下記の通りである。



この酵素の測定は従来SOD活性として行われており、癌組織においてはSOD活性は低下しているという報告が多い。これに対し、ポリクローナル抗体を用いた免疫化学的方法による研究では、Mn-SOD活性と酵素蛋白量は必ずしも比例せず、癌組織には不活性化した酵素が存在していることが示され、免疫化学的方法で求めた酵素蛋白量はむしろ増加することが報告されている²⁾。われわれは、ヒトMn-SODの大量精製法を確立し、結晶化に成功した。これを用いてモノクローナル抗体を作成したところ、そのエピトープはC末端近傍のペプチドに存在した⁶⁾。このモノクローナル抗体を用いて、骨盤内腫瘍の組織学的検討ならばに、ELISA⁹⁾による血清中Mn-SOD濃度を各種産婦人科患者で測定したところ、卵巣癌にMn-SODの発現が著しいことを初めて発見した^{10)~12)}。このMn-SOD蛋白は血清中に出現し、卵巣癌の特異的マーカーになることが考えられる。今回、卵巣癌におけるMn-SODの発現機構ならびに、その臨床的意義について、われわれの成績

表 1 健康人における血中 Mn-SOD 値

Age	Sex	No.	Mu-SOD Values(ng/ml)	
			Mean	Mean±2SD
~19	M	40	91	55~127
	F	40	86	53~118
20~29	M	40	103	62~143
	F	40	83	48~118
30~39	M	40	102	54~151
	F	22	82	43~121
40~49	M	40	107	54~160
	F	40	98	56~140
50~59	M	29	96	36~155
	F	40	97	53~142
60~69	M	2	57	—
	F	8	81	55~106
70~79	M	3	88	—
	F	17	82	30~133
	male	194	100	50~149
	femele	207	89	47~130
	total	401	94	47~141

をもとに解説する。

I. Mn-SOD のモノクローン抗体ならびに ELISA による血中濃度測定

モノクローン抗体は、正常肝より精製した Mn-SOD を BALB/C マウスに免疫して作製した。この抗体は、Mn-SOD の C 末端部分の合成ペプチドと反応することから、C 末端付近を認識していると考えられる。このモノクローン抗体を用いた ELISA の測定感度は 2-200 ng/ml であり、特異性は高く他の蛋白には交叉性がなく、Cu, Zn-SOD にもほとんど交叉性を示さなかった。再現性に関しては、対照血清について 6 回行い、その CV は 3% であ

た⁹⁾。

II. 健康人ならびに各種産婦人科疾患と Mn-SOD

1. 健康人における血中 Mn-SOD 値

健康の男性 195 名、女性 207 名の年齢別の Mn-SOD 値を表 1 に示す。女性の平均値は 89 ng/ml (mean±2SD, 47~130 ng/ml), 全体の平均値は 94 ng/ml (mean±2SD, 47~141 ng/ml) となったため、cut off 値と 130 ng/ml に設定した (表 1)。

2. 骨盤内良性腫瘍における Mn-SOD 値

骨盤内良性腫瘍の術前における Mn-SOD の血清値を検討すると、子宮筋腫は 44 例中 3 例、6.8%、良性卵巢腫瘍 33 例中 4 例、12.1%、子宮内膜症 59 例中 7 例 (11.9%) の陽性率であった。また、その Mn-SOD の分布も 100 ng 前後であり、200 ng/ml を超えるものは認められなかった (図 1)。一般に良性の婦人科腫瘍における陽性率は 10% 台であった。

3. 婦人科悪性腫瘍における Mn-SOD 値

婦人科悪性腫瘍の Mn-SOD 値が 130 ng/ml 以上の陽性率をみると子宮頸癌 44 例中 7 例、15.9%、子宮体癌 35 例中 2 例 5.7% であり、その陽性値も 150 ng/ml を超えるものはほとんどなかった。しかし、卵巢癌においては 57 例中 33 例、57.9% の高い陽性率を示し、その値も 200 ng/ml を超えるものが多くあった (図 2)。

4. 卵巢癌と Mn-SOD¹⁰⁾¹¹⁾

このように、卵巢癌患者の血中に特異的に発現する Mn-SOD についてさらに検討を加え

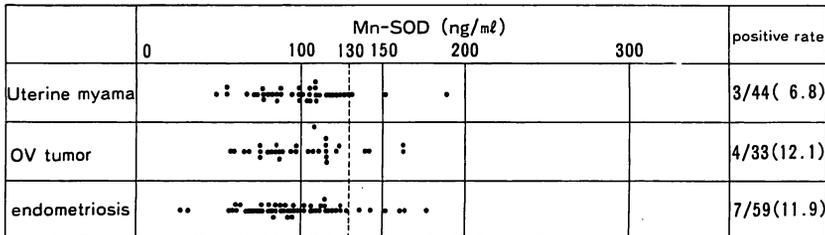


図 1 骨盤内良性腫瘍における Mn-SOD 値

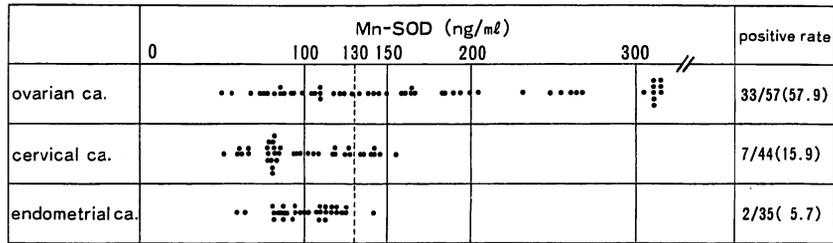


図 2 婦人科悪性腫瘍における Mn-SOD 値

表 2 卵巣癌における Mn-SOD の術前値と組織形別分類

	Mn-SOD
serous ca.	9/14(64.3%)
mucinous ca.	1/ 5(20.0%)
endometrioid ca.	7/ 9(77.8%)
mesonephroid ca.	4/ 7(57.1%)

た。術前の血清値と卵巣癌の組織形別分類でみたものが表 2 である。漿液性嚢胞腺癌症例数が多く、14 例中 9 例、64.3%で、その他類内膜癌および類中腎癌が各々 77.8%、57.1%であった。しかしムチン性嚢胞腺癌の陽性率は 20%と低かった。また、非上皮性悪性卵巣腫瘍においては、Mn-SOD 値が 130 ng/ml 以上を示す例は 1 例もなかった。以前の検討で、悪性卵巣腫瘍において、上皮性と非上皮性の平均値を比較すると有意に上皮性の Mn-SOD 値が高かった (表 3)。さらに、23 例の卵巣癌において、臨床進行期別に検討してみると、I 期の陽性率と比較して II 期以上の Mn-SOD の陽性率が有意に高かった (表 4)。

次に、卵巣癌における Mn-SOD の臨床的意義について検討した。図 3 に、漿液性嚢胞腺癌 FIGO の臨床進行期 III 期の症例と代表例として示す。cytoreduction surgery と chemotherapy により、CA-125 値に平行して Mn-SOD が減少した。second look ならびに third look laparotomy において腫瘍の残存は認められず、経過観察を行っている。このように Mn-SOD は CA-125 と近似した推移を示した (図 3)。さらに、卵巣癌 24 例に関して、術前値に

表 3 卵巣癌の上皮性と非上皮性の Mn-SOD の平均値

Types	Total no. tested	Mean value (ng/ml)	p ^a
Epithelial	23	194.8	p < 0.01
Nonepithelial	10	92.4	

^a Calculated using Wilcoxon's rank sum test.

表 4 卵巣癌の臨床進行期別と Mn-SOD 値

Stages	Total no. tested	No. above 150 ng/ml	p ^a
I	10	2(20.0) ^b	p < 0.05
II + III + IV	13	10(76.9)	

^a X² test.

^b Numbers in parentheses, percentage.

加え術後ならびに化学療法後における経過観察期間における Mn-SOD の推移を検討した。治療効果判定は、固型癌化学療法直接効果判定規準を下に、CT、超音波エコーなどの他覚所見から、Complete Response (CR), Partial Response (PR), No Change (NC), Progressive Disease (PD) と判定した規準により、病態を、Regressed, Stabilized, Progressed とした。その間の Mn-SOD level の変動は 49~1925 ng/ml の間であった。Regressed の病態においては 150 ng/ml を超えた 1 例を除いて、8 例はすべて 150 ng/ml 以下に下降した。Mn-SOD の上昇中、150 ng/ml 以上を維持した 10 例中 8 例に病態の progressed が見られた (図 4)。

卵巣癌において、腫瘍マーカーとして最も利用されている CA-125 との関連を検討した。

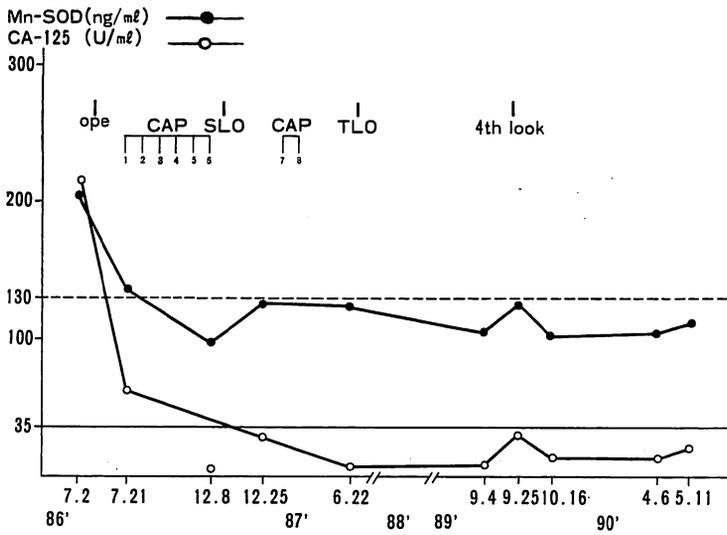


図 3 症例

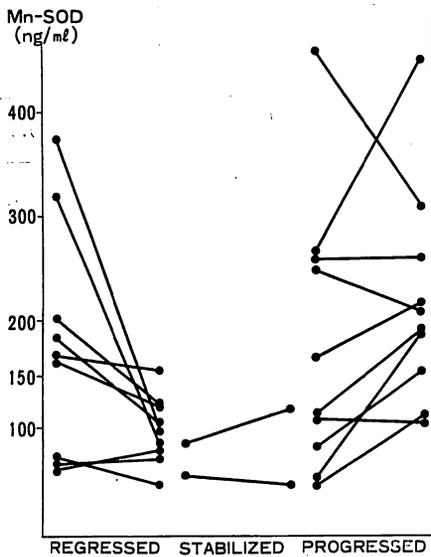


図 4 卵巣癌患者の病態の推移と Mn-SOD 値

表 5 卵巣癌における Mn-SOD 値と CA-125 値との関連

	Mn-SOD > 130 ng/ml	Mn-SOD < 130 ng/ml
CA125 > 35 U/ml	28	13
CA125 < 35 U/ml	5	10

うな症例において、CA-125 に代り、Mn-SOD はマーカーになり得ると考えられる。

今回、Mn-SOD と CA-125 の同時測定可能であった卵巣癌 34 例と、子宮筋腫、良性卵巣腫瘍、子宮内膜症などの婦人科良性腫瘍 90 例、計 124 例における卵巣癌診断精度を比較してみた(表 6)。その結果、Mn-SOD は CA-125 に比し、感受性は低いが特異性が高いため、卵巣癌における診断効率 は CA-125 が 71.8% なのに対し、Mn-SOD は 79.8% と高くなり、Mn-SOD の卵巣癌診断における有用性が示唆された。

まとめ

卵巣癌において、Mn-SOD がなぜ発現するのであろうか？ Mn-SOD のモノクローン抗体を用いた間接酵素抗体法において、Mn-SOD の局在を検討した。その結果、正常卵巣には染

Mn-SOD の cut off 値を 130 ng/ml, CA-125 の cut off 値を 35 U/ml とすると、両測定法とも陽性例が 56 例中 28 例、両測定法とも陰性のものが 10 例あった。しかし、Mn-SOD 値が cut off 値以下で、CA-125 値が陽性のものが 13 例、逆に CA-125 が陰性で、Mn-SOD 値が陽性のものが 5 例あった(表 5)。このよ

表 6 骨盤内腫瘍における Mn-SOD と CA-125 の卵巣癌診断精度の比較

	Mn-SOD	CA-125
sensitivity	58.8%(20/34)	82.4%(28/34)
specificity	87.8 (79/90)	67.8 (61/90)
false positive rate	12.2 (11/90)	32.2 (29/90)
false negative rate	41.1 (14/34)	17.6 (6/34)
diagnostic value*	79.8 (99/124)	71.8 (89/124)

* true positive + true negative
total patients with/without disease

色性は認められず、非上皮性悪性卵巣腫瘍においても同様であった。また、子宮頸癌や子宮体癌の婦人科悪性腫瘍においても染色性を示すものは少なかった。一方、卵巣癌は大部分の検体において、明らかな染色性が認められ、卵巣癌における Mn-SOD の局在が確認された¹⁰⁾。最近、Mn-SOD の発現に関して、TNF との関連を示唆する報告がなされている¹³⁾¹⁴⁾。われわれの未発表の成績でも卵巣癌の細胞株 Kuramochi に TNF を添加したところ、容量依存的に細胞内の Mn-SOD の増加を認めた。しかし、Cu, Zn-SOD の変化は認められなかった。

以上の成績から、卵巣癌患者血中に Mn-SOD が特異的に増加する理由として、第1に、卵巣癌腫瘍では Mn-SOD の産生が増加していることがあげられる。さらに卵巣癌において IL-1 や、TNF 産生による Mn-SOD の発現、マイクローフェージ活性化によって起きる O_2^- 産生が引き起こす Mn-SOD の産生増加などが複雑に関連していることが考えるが、その詳細な機構の解明は今後の研究に待たねばならない。

今後、卵巣癌における Mn-SOD の発現の臨床的意義として、特異的な腫瘍マーカーとなることが期待されるが、前述の基礎的研究と相まってその期待は完成されると考えている。

(稿を終わるに当たり、研究に御協力いただいた、国立札幌病院産婦人科、山下幸紀、斉藤康子、兼元敏隆、札幌厚生病院産婦人科、土門洋哉、斗南病院産婦人科、神谷博文、東京大学第一内科、遠藤康夫、

大阪大学生化学、谷口直之の諸先生に感謝する。)

文 献

- 1) Oberley, L.W. and Buettner, G.R.: Role of superoxide dismutase in cancer: a review. *Cancer Res*, **39**: 1141~1149, 1979.
- 2) Iizuka, S., Taniguchi, N. and Makita, A., Enzyme-linked immunosorbent assay for human manganese-containing superoxide dismutase and its content in lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, **72**: 1043~1049, 1984.
- 3) Weisinger, R.A. and Feidovich, I.: Mitochondrial superoxide dismutase: site of synthesis and intramitochondrial localization. *J. Biol. Chem.*, **248**: 4793~4796, 1973.
- 4) Marklund, S., Human L.: coppercontaining superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **79**: 7634~7638, 1982.
- 5) Karlsson, K. and Marklund, S.L.: Extracellular superoxide dismutase in the vascular system of mammals. *Biochem. J.*, **255**: 223~228, 1988.
- 6) McCord, J.M. and Fridovich, I.: Superoxide dismutase-an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, **244**: 6049~6055, 1969.
- 7) Weisinger, R.A. and Fridovich, I.: Superoxide dismutase: organell specificity. *J. Biol. Chem.*, **248**: 3582~3592, 1973.
- 8) Kawaguchi, T., Noji, S., Uda, T., Nakashima, Y., Yahagi, A., Kawai, Y., Takagi, H., Tohyama, M. and Taniguchi, N.: A

- monoclonal antibody gainst COOH-terminal peptide of huan liver manganese superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.*, **264** : 5762~5767, 1989.
- 9) Kawaguchi, T., Suzuki, K., Matsuda, Y., Nishimura, T., Uda, T., Ono, M., Sekiya, C., Ishikawa, M., Iino, S., Endo, Y. and Taniguchi, N. : Serum-Manganese-superoxide : normal values and myocardial infarction and several malignant diseases determined by an enzyme-linked immunosorbent assay using a monoclonal antibody. *J. Immunological Method*, **127** : 249, 1990.
- 10) Ishikawa, M., Yaginuma, Y., Hayashi, H., Shimizu, T., Endo, Y. and Taniguchi, N. : Reactivity of a Monoclonal Antibody to Manganese Superoxide Dismutase with Human Ovarian Carcinoma. *Cancer Res.*, **50** : 2538~2542, 1990.
- 11) 石川睦男, 柳沼裕二, 林 博章, 清水哲也, 山下幸紀, 遠藤康夫, 谷口直之 : 卵腫瘍におけるマンガン, スーパーオキシドディスムターゼ (Mn-SOD) の意義. *日産婦誌*, **42** : 363~364, 1990.
- 12) 石川睦男, 林 博章, 齊藤 聡, 清水哲也, 山下幸紀, 齊藤康子, 兼元敏隆, 土門洋哉, 神谷博文, 遠藤康夫, 谷口直之 : 卵巣癌における, 血清マンガン, スーパーオキシドジスムターゼ (Mn-SOD) 測定の臨床的意義 (日産婦誌, 投稿中)
- 13) Wong, G.H.W. and Goeddel, D.V. : Induction of Manganese superoxide dismutase by tumor necrosis factor : Possible protective mechanism. *Science*, **242** : 941~944, 1988.
- 14) Wong, G.H.W., Elwell, J.H., Oberley, L.W. and Goeddel, D.V. : Manganese superoxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor. *Cell*, **58** : 923~931, 1989.

* * * *

* * *