

## ラクトフェリン研究の最前線

—第8回ラクトフェリン国際会議に参加して—

清水 洋彦  
技術士（生物工学）

筆者は、ラクトフェリン（以下、LFと略す場合がある）実用化研究の最新動向を調査する目的で、ニースでの第8回ラクトフェリン国際会議に参加したので、会議で報告されたトピックスや最新の研究成果も交えてLF研究の最前線をご紹介します。LFに関心のある読者の参考としたい。今回の調査結果は、平成17年度採択NEDO助成事業である大学発事業創出実用化研究開発事業「創薬シーズPEG-ラクトフェリンの前臨床技術パッケージの作成」プロジェクトに活かされることになっている。

この国際会議は、LFという魅力的な生理活性タンパク質に関心のある各分野の研究者の情報交換の場として、2年に一度開催されており、最初の会議が1993年に開催されて以来、LFの構造、機能、及び応用といった幅広い分野、領域の研究者が一堂に介する研究討論の場となっている。第8回会議は、2007年10月21日～25日、南フランス・ニースの海岸に近いポスコロ・プラザ・ホテルで開催された。コート・ダジュール(紺碧の海岸)と呼ばれるニースの海の色はさすがに印象に残る美しさであった。

写真1. ニースの海岸風景



学会事務局の発表によると、参加者は全体で140名（前回のハワイ会議：119名）で、日本からは約40名（全体の約29%、前回：約47名、全体の約40%）の参加があった。

発表は、基礎から応用まで、9つのセッション（表1）に分かれて、口頭発表が全部で50演題（前回：41演題）、ポスター発表が40題（前回：37題）であった。そのうち、日本からの発表は、口演13演題、ポスター16題で、全体の約32%を占め、過去最大とのことであった。

全体としては、長年、LFの医薬開発に取り組んでいる米国アジェニックス社が参加しなかったこ

と、日本におけるC型肝炎への臨床応用研究が峠を越したことなどから、臨床関係の発表がやや下火になった感が否めない。そういう中で、オーラル分野への応用が日本で活発になりつつあり、腸溶製剤と非腸溶製剤を比較した口臭抑制に関する二重盲検臨床試験により腸溶製剤の優位性が明確に示されたこと、これまで日本のLF研究を引っ張ってきた津田洋幸教授（名古屋市大）からLFの大腸ポリープ退縮に関する大がかりな二重盲検臨床試験結果の概要が報告され注目されたこと、旧ソ連各国でのLF研究が盛んになりつつあること、LFの骨形成作用に関する研究が着実に進んでいることなどが印象に残った。また、LFのリセプターをクローニングしたカリフォルニア大学のLoennerdal教授が、「リセプター介在性の細胞内取り込み」について発表し、多くの研究者からLFが細胞内で遺伝子発現調節に関わっていることも報告され、LFの全ての作用ではないものの、LFが遺伝子レベルで作用することについてはほぼ確認されたと言える。

表1. 各セッションの内容

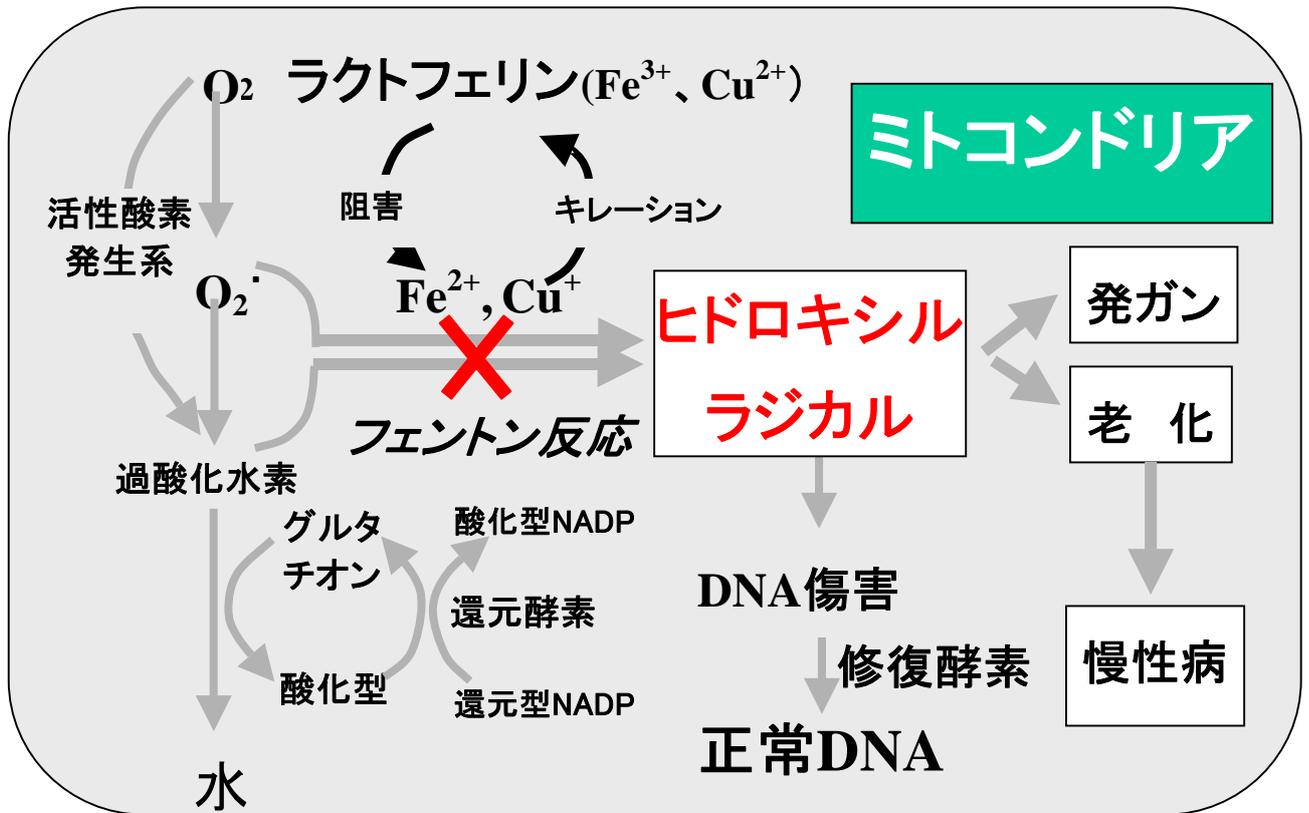
- Session 1- Lactoferrin:structure-function relationship
- Session 2- Lactoferrin expression and regulation
- Session 3- Lactoferrin receptors
- Session 4- Lactoferrin immuno-modulatory and inflammatory properties
- Session 5- Regulation of cell cycle and apoptosis by lactoferrin
- Session 6- Growth-promoting activity of lactoferrin
- Session 7- Antimicrobial activity of lactoferrin
- Session 8- Antimicrobial activity of lactoferrin-derived peptides
- Session 9- Lactoferrin application in health/novel functions

## ラクトフェリンの抗酸化ストレス作用に関する注目すべき研究成果

2年ごとに開催される国際会議の間を埋める形で、2004年から日本でラクトフェリンフォーラムが開催されるようになり、昨年11月に東京国際フォーラムで開催された第2回フォーラムでも、いくつかの注目される研究発表があった。その中で、今回の国際会議には出題されなかったが、ラクトフェリンの抗酸化ストレス作用に関する画期的な研究報告があるのでご紹介したい。

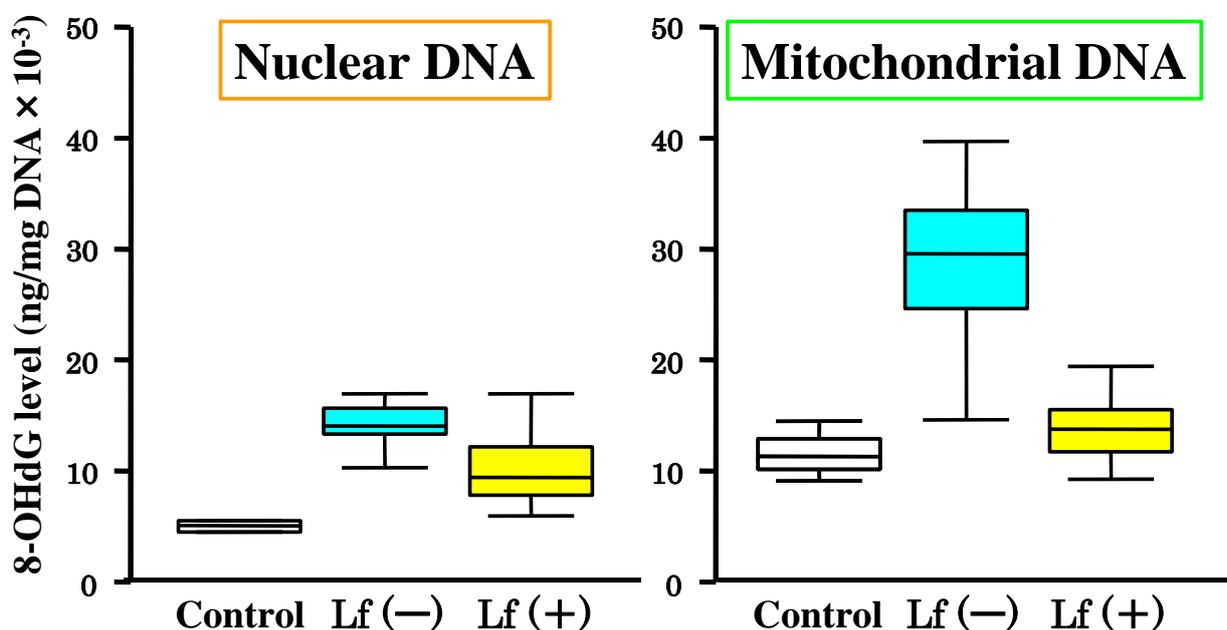
LFは、母乳、特に初乳に多く含まれる鉄結合性の生理活性タンパク質で、成人においても涙、唾液、腠液その他の外分泌液や好中球に含まれている。体内のLFは、大部分がアポ型であるが、3価の鉄イオンや2価の銅イオンに出会うと強くキレート結合し、フェントン反応と呼ばれる触媒反応により悪玉活性酸素ヒドロキシラジカルが生成するのを阻止する。ヒドロキシラジカルは極めて短寿命であるが酸化力が強く、細胞のエネルギー産生器官であるミトコンドリアの膜脂質やDNAを障害し、発がんや老化、或いは生活習慣病、免疫異常、神経変性疾患など、様々な慢性疾患の要因となっていることが指摘されている（図1）。

図1. ラクトフェリンによるフリーラジカル生成阻害



慈恵医大・坪田昭人博士らのLECラットを用いた実験で、この酸化ストレスをLFが抑えることが分かった。LECラットというのは、肝臓に銅が蓄積するため、それに起因する酸化ストレスで劇症肝炎を起こして死んでしまうモデル動物で、ウィルソン病という遺伝疾患のモデルとされている。坪田博士らは、LECラットにLFを経口摂取させると死亡率が大幅に低下することを見出し、この原因を詳しく解析した結果、LFがミトコンドリアDNAの酸化障害を抑制する一方で、DNA修復酵素のプロモーター部位のメチル化を抑えることにより、DNA修復機能を保つという二重のメカニズムで、ミトコンドリアDNAの異常を抑制し、かつ、細胞構造の障害及びアポトーシスを抑制していることを突き止めた(図2)<sup>1)</sup>。

図2. LECラット肝臓の細胞核とミトコンドリアDNAの8-OHdG



われわれが生きてためには酸素が必要であり、一方では、赤血球による酸素の運搬や体内の酸化還元反応などの重要な機能はヘム鉄に依存している。酸素と鉄は生命活動に必須であると同時に、われわれは常に酸素の活性化に伴う酸化ストレスにさらされながら加齢、老化の道を進む宿命にあると言える。LFがこのようなメカニズムでミトコンドリアの機能異常を抑えること分かったことは、LFの多面的な機能を理解する上で有力な手がかりになる。NIHのDr. Tengも指摘しているように、人類は特にLFへの依存度が高く、母乳から与えられるLFが乳児の発育を支えるだけでなく、真の意味でのアンチエイジング物質として、老化を防いでいつまでも若々しく生きることが出来るように、まさに“ゆりかごから墓場まで”、われわれの健康を支えてくれる重要な生理活性タンパク質であることが分かる。

### ラクトフェリンの体内移行

LFの作用としては、この酸化ストレス抑制作用以外にも、従来から、抗菌・抗ウイルス作用、抗炎症・抗アレルギー作用、免疫調節作用、抗がん作用など、様々な作用を示すことが注目されており、最近では、脂質代謝改善作用<sup>2)</sup>、鎮痛・抗不安作用<sup>3)</sup>、骨形成作用<sup>4)</sup>など、新たな生理作用が次々と見出されている。問題は、細胞レベルの実験や動物実験では様々な効果が認められるのに、臨床試験を行うとなかなか明確な有効性を確認できない、或いは、LF粉末を固めた錠剤がサプリメントとして販売されているが、通常の摂取量では、はっきりとした効果を実感しにくいという点であるが、最近、この理由が明らかになってきた。

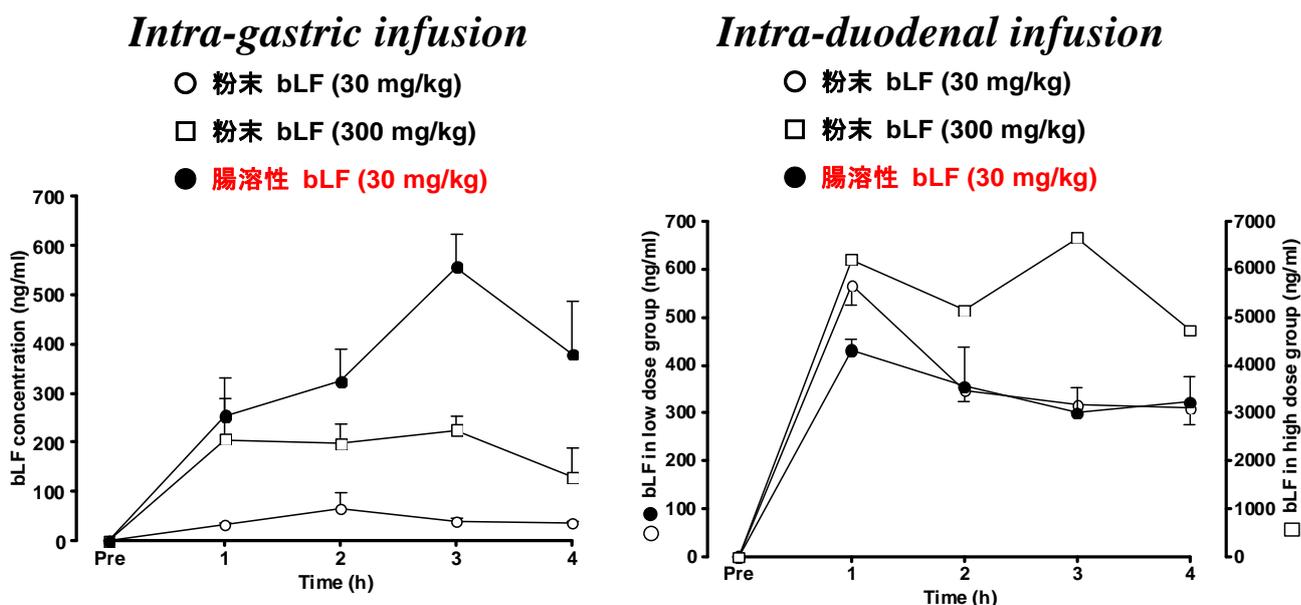
近年のバイオテクノロジーの進歩により、インターフェロン、GSF、エリスロポエチンなど、生体内で作用している生理活性タンパク質を医薬品として開発する動きが高まり、慢性C型肝炎の治療や、白血球や赤血球を増やすことなどに用いられている。医薬品になりそうなめぼしいタンパク質がタネ切れになって、昨今では、TNF $\alpha$ のような悪玉サイトカインの作用を抗体で抑えてリウマチを治療するなど、いわゆる抗体医薬品の開発も盛んになっている。このように生体内で機能している生

理活性タンパク質をターゲットとする医薬開発の大きなうねりの中で、奇妙なことにLFという哺乳類の生存に極めて重要な役割を担っているタンパク質が、医薬品化のターゲットにならなかった。その理由の一つに、LFが母乳に含まれるタンパク質であることから、食品として摂取され、胃で分解されるのが当然という考えがあったためと思われる。その結果、これまでLFをそのままの形で経口的に摂取することが一般的に行われ、健康サプリメントとして商品化され、臨床試験が行われたりしてきた。当然のことであるが、インターフェロンのようなタンパク質医薬品は、経口摂取ではタンパク質分解酵素によって消化分解されてしまうので、通常、注射剤として用いられる。LFの場合も胃内でペプシンによる消化を受けやすいことが知られており、分解されたものは、もはやLFではなくなっているので、LFとしての生理活性を発揮しなくなってしまうことは、いわば当然のことである。ところが、LFの場合は、胃で消化分解されずに腸まで届けば、腸管からリンパ系を介して体内に移行すること、従って、いわゆる腸溶製剤の形にすれば、経口投与により効果を発揮できる珍しいタンパク質であることが、鳥取大学農学部獣医生理学教室で原田悦守教授（当時）の指導のもとに行われた精力的な研究によって明らかにされたのである。

原田らは、長年、ミルク由来のタンパク質成分の腸管からの体内移行について研究を重ねた結果、新生仔の場合は、胃の消化機能が未発達で、LFや母乳の抗体成分などのタンパク質もそのまま腸まで届き体内に吸収されるが、いわゆるガットクロージャーが起こって胃内での消化分解が正常に行われるようになると、タンパク質であるLFも胃で分解されてしまうが、腸溶性にすると分解されずに腸まで届いて、リンパ系を介して体内に移行することを明らかにした（図3）<sup>5, 6, 7</sup>。すなわち、図3. に示されるように、ラット胃内投与では、粉末LFは消化分解され、リンパ液への取り込みが少ないが、腸溶性の場合は、10~20倍効率よく体内に移行する一方で、十二指腸投与では、胃での分解がないため、粉末でも腸溶性でも大きな差が認められないことが分かる。ラットに比べて胃での滞留時間が長いヒトでは、この差はさらに大きいであろうことが容易に推測される。

図3.

## 腸溶性bLFの胃内投与と十二指腸内投与による胸管リンパ液への取り込み



原田らは、現在、前述のNEDOの助成事業により、LFの生理機能にもとづいた医薬品を開発す

るため、東京工科大学の佐藤淳准教授らが開発したPEG化LF製造技術をもとに、東京工科大学、鳥取大学、酪農学園大学の共同研究開発プロジェクト（管理人：よこはまティーエルオー株式会社）として、「PEG化ラクトフェリンの実用化開発」に精力的に取り組んでいる。今回の国際会議での発表は見送ったが、研究開発は狙い通りの進展を見せており、PEG化によって生物活性はほとんど失われず、ペプシンなどのプロテアーゼにも抵抗性になって、体内寿命が約10倍延長されること、腸管からの体内移行もPEG化LFの方がむしろ効率がよいことなどが明らかになっており、現在、プロジェクトの最終年度を迎えて、PEG化LFの薬効評価が進められているところで、いずれ日本発のLF創薬研究が実を結ぶことが期待される<sup>8、9、10</sup>。

## ラクトフェリン腸溶製剤の臨床応用

原田らの研究に後押しされる形で、最近、LFが胃で消化分解されないように工夫した腸溶製剤が開発され、サプリメントとして数社から市販されるようになり、市場の注目を集めている。腸溶製剤のメリットについては、LFの中樞作用、肝臓での脂質代謝改善作用やミトコンドリアDNAへの作用などを考えると、経口投与されたLFが体内に移行して標的臓器に到達して作用していることは明らかであるものの、医薬品として開発するには、血中濃度を含む体内動態の解明など、明らかにすべき課題も多く、現在、「PEG化ラクトフェリンの創薬研究」において、LFの体内動態の解明を重点課題として、鳥取大学・竹内崇教授らによって精力的に検討が進められているところである。

そういう状況の中で、LFが安全な食品であるということに基づき、LF腸溶製剤を用いて様々な臨床応用の試み（いわゆるトランスレーショナル臨床試験）がなされており、LFの効果が医学的に確認されつつある。特に、今回、佐藤保博士ら（歯科ラクトフェリン研究会）から、LFの口臭抑制効果について、腸溶製剤と非腸溶製剤とを比較したはじめての二重盲検臨床試験により、腸溶製剤の優位性が明確に示され、LF研究の指導的立場の多くの専門家から注目を集めたことが特筆される。今後、このような比較臨床試験が多くの疾患について実施され、LFの臨床的有用性に関するしっかりした医学的エビデンスが蓄積されることにより、LFの体内動態、薬物動力学の解明とあいまって、LFの医薬品化への道が拓けることが期待される。

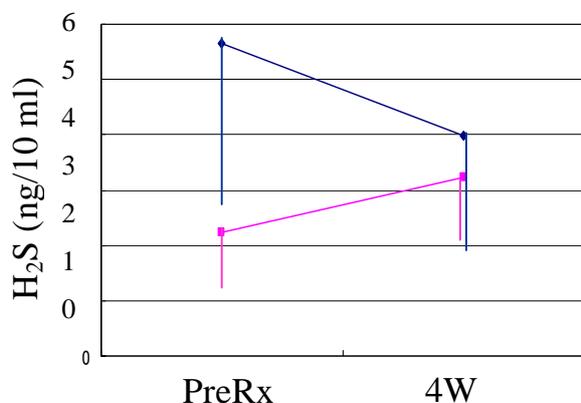
写真2. 佐藤保博士のポスター発表を見るベーカー教授（同教授の諒承を得て掲載）



この試験では、33歳から72歳の合計14名の患者（男5名、女9名）をランダムに2群に分け、毎日300mgのLFを4週間、腸溶性カプセルとして投与する群と非腸溶性LFとして投与する群について、揮発性硫黄化合物、硫化水素、メチルメルカプタン、デメチルサルファイド等を測定した。

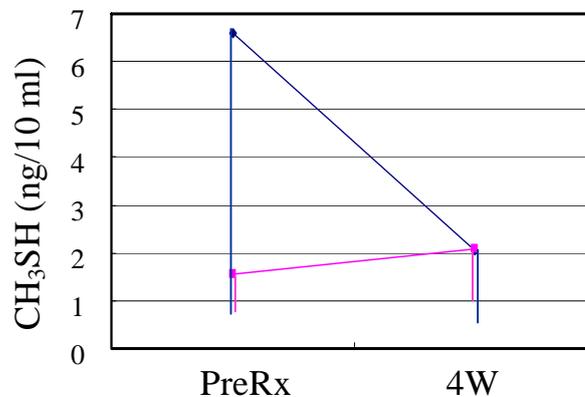
図4. に結果の一部を示すが、いずれの場合も腸溶性LFを投与した場合に明らかに効果があり、舌苔の厚さも減少していた。

## 図4. Changes in H<sub>2</sub>S and CH<sub>3</sub>SH



(A) Changes in H<sub>2</sub>S

Mean-SE, n=7, Blue, enteric coated and pink, non-enteric coated



(B) Changes in CH<sub>3</sub>SH

Mean-SE, n=7, Blue, enteric coated and pink, non-enteric coated

この他に、昭和大学医学部の大槻克文博士らの研究グループからは、病院の女性スタッフ10名に、1日500mgのLF腸溶製剤を2週間以上摂取してもらった結果、便秘の改善に有効であったことが報告された。今回、スケジュールの都合で学会参加を見合わせた鳥取大学医学部・前田隆子教授らは、平均年齢21歳の健康な女子学生22名について、月経開始3日前から開始後4日までの間、1日600mgのLF腸溶製剤を摂取する試験を実施し、月経痛緩和に効果が認められたことを報告している<sup>11)</sup>。

### その他の注目される話題

#### 【大腸ポリープ退縮に関する臨床試験】

津田洋幸教授（名古屋市大医学部）から、直径5mm以下の大腸ポリープを有する108名の患者をランダムに3群に分け、それぞれプラセボ剤、LF製剤（非腸溶性）を1.5g/day及び3.0g/dayで12ヶ月投与する大規模な臨床試験の結果の概要が報告された。現在、論文投稿中とのことで、詳細データは省くが、3.0g/day投与群で、ポリープの増殖を抑制する傾向が認められたとのことであった。前回のハワイ会議で非小細胞肺癌の化学療法にLFの溶液製剤を併用するフェーズII臨床試験の成功を発表したアジェニックス社の例から考えても、非腸溶性LFの場合、3.0g/dayの投与量は明らかにドーズ不足と考えられ、もっと大量に投与すれば、さらに効果が認められたのではないかというのが筆者の率直な感想であり、折角の研究者の努力が報われないのは誠に惜しいという気がする。興味深いことに、3.0g/day投与群で血中のヒトLF濃度の上昇が認められた。血中ヒトLFは、主に好中球から放出され、東邦大学医学部・石井らの研究によって、炎症の早期マーカーとして位置づけられている<sup>12)</sup>。炎症マーカーと言っても、LFの場合は、炎症を抑えるための生体の防御反応の一環と考えられるが、LF製剤の摂取と血中ヒトLF濃度の変化との関係は、今後、経口投与されたLFの生体内での薬理作用を解明する上で、注目すべき指標になるものと考えられる。

#### 【骨成長作用】

ニュージーランド、オークランド大学のDr. Cornishらの研究グループからLFの骨成長（骨量増加）作用について前回に続いて報告があった。骨量の調節は、骨を作る骨芽細胞と骨を溶かす破骨細胞

胞の作用の動的なバランスによってなされている。今回の発表では、L Fが骨芽細胞の分化、増殖を促進し、かつ、破骨細胞を減らすことを明らかにすると同時に、これらのプロセスに関わる遺伝子を細胞レベルで詳しく解析した結果について報告された。骨芽細胞の増殖に関与するリセプターは、L D Lリセプター関連タンパク質の一つであるLRP 1であることを突き止めた。また、MAPK, P I 3-Kが関与するAktリン酸化を明らかにした。破骨細胞についても、遺伝子発現、シグナル調節に関する同様の検討を進めており、数年前までは、L Fが細胞に入るかどうか自体が議論されてきたが、韓国のDr. Choiらの細胞内シグナル伝達におけるL Fの役割に関する研究などともあいまって、L Fが細胞内で遺伝子レベルで作用していることについては疑う余地がなくなってきた。

### 【リセプター介在性の細胞内取り込み】

L Fリセプターをクローニングしたカリフォルニア大学のLoennerdal教授は、ヒト腸管由来細胞株Caco-2細胞を用いて、L Fがリセプター介在性に細胞内に取り込まれること、その際、エンドソーム外膜を形成することが知られているクラスリンというタンパク質が関与することを明らかにした。同教授は、L F研究のリーダーの一人であるが、前述の佐藤博士のポスター発表について、L Fは胃で壊れないようにして、インタクトな分子として腸管の受容体に届けることが大切であると考えていると説明したところ、「自分も全く同感である」とのことであった。

### 【腫瘍とL F遺伝子の異常】

アイスランドのランドスピタリ大学病院の病理学者、Dr. Petursdottirらは、ヒト腫瘍で異常が見られる第3染色体を詳しく解析し、肺がんの9.4%にL F遺伝子を含むCER 1部位が欠損していることを明らかにした。実際に、ヒト肺がん組織のL Fの発現を調べたところ、Adenocarcinoma 32例中、30例(94%)、Squamous cell 22例中、19例(86%)でL Fが発現していないことが分かった。その他、例数はすくないが、調べたCarcinosarcoma 1例、Large cell anaplastic 3例、Adenosquamous 2例、すべてがL F陰性であった。このことは、肺がんの治療にL Fが有効であることにつながる可能性を示しているのかも知れない。

### 【ヒト乳由来L Fの臨床応用】

モスクワのがん研究所のDr. Yakubovskayaらは、ヒトの乳からL Fを精製した”Laprot”という名前の製品を血管手術、がんの外科切除などの術後感染症の治療に使用していることを報告した。報告によると、”Laprot”は、抗酸化作用、抗炎症作用、解毒作用があり、50-100mgを5日間、静注することにより、全例で中毒症状が軽減され、白血球や肝機能の改善が見られたという。ヒト乳由来のL Fとヒト好中球由来のL Fについて、それぞれに対する抗体との反応性で調べているが、若干性質が異なるようであった。量的に生産は間に合うのかとの質問が出たが、問題ないとの答えであった。ずいぶん、思い切ったことをやるものであるが、わが国におけるインターフェロンの実用化研究の初期も、昭和40年代に旧ソ連でヒト白血球から調整したサンプルを輸入して研究が始まったことが思い出された。

### 今後の展開

L Fの実用化研究は、1980年代に始まったが、今回で8回目を迎えた国際会議に参加した印象は、一言で言えば、単なる乳由来の食品成分としてのL Fから、経口投与可能な、重要な生理活性タンパク質としての位置付けへ、L F研究が大きな曲がり角に差し掛かっているのではないかということを感じさせた。C型肝炎を中心に、わが国で行われてきた非腸溶製剤を使った臨床試験は、期待されたほど思わしい結果が得られないまま、オーラル分野への応用に活路を見出そうとしている。今回は、L Fとは違う物質であるということから、あえて話題として取り上げなかったL F由来の抗菌性ペプチドに関する研究も、いまだに有望な抗菌剤が得られたという話を聞かない。長い間、L Fが細胞内に入るのかが議論され、門脈血に検出されないからL Fは体内に入らないと言われていたのに、細胞の核内で遺伝子発現の調節に関わっていることはもはや疑いのない事実であることが明らかになりつつあり、分子量8万の巨大なタンパク質であるL Fが、実は腸管からリンパ系経由で体内に移行する経路があることが科学的に証明され、実際に腸溶製剤を用いることにより、一日あたり数百mgという少量で明確な臨床効果が得られることが分かってきた。L Fの新規機能として、消化管内だけでなく、鎮痛・抗不安作用、脂質代謝改善作用、骨形成作用など、体内で確かに生理的に機能していることも分かってきた。抗酸化ストレス作用のメカニズムや細胞の増殖・分化、アポトーシスにおけ

るLFの役割が遺伝子レベルで説明できるようになりつつある。これらのLF研究の進展を背景に、わが国で医薬品化へ向けた研究開発が国による支援を受けて進められており、また、実用面では、わが国で開発された腸溶製剤を利用した健康サプリメント事業が急速な拡大を見せている。LFは、正しい使い方をすれば、活力ある高齢化社会を担う健康サプリメントとして活用されるようになると同時に、適切な治療法のない、がん、骨疾患、免疫疾患、神経変性疾患、生活習慣病などの治療薬として、人類の健康の維持・増進に役に立つときが来るのも夢ではなく、そのために今後も微力ながら努力したいと考えている。

以上

(参考文献)

- 1) 坪田昭人他、“ラクトフェリン2007：ラクトフェリン研究の新たな展開と応用へのメッセージ”、94-99頁、第2回ラクトフェリンフォーラム実行委員会編集、日本医学館(2007)
- 2) Takeuchi, T., et al., *Br J Nutrition* **91**:533-538 (2004)
- 3) 原田悦守、慢性疼痛 **23**(1)、9-23 (2004)
- 4) Cornish, J., et al., *Endocrinology* **145**(9): 4366-4374 (2004)
- 5) 原田悦守、医学のあゆみ、**198**, 959-964(2001)
- 6) Takeuchi, T., et al., *Exp Physiol* **89**: 263-270 (2004)
- 7) Takeuchi, T., et al., *Exp Physiol* **91**: 1033-1040 (2006)
- 8) 野島康弘他、“ラクトフェリン2007：ラクトフェリン研究の新たな展開と応用へのメッセージ”、43-49頁、第2回ラクトフェリンフォーラム実行委員会編集、日本医学館(2007)
- 9) 志賀常雄他、“ラクトフェリン2007：ラクトフェリン研究の新たな展開と応用へのメッセージ”、111-117頁、第2回ラクトフェリンフォーラム実行委員会編集、日本医学館(2007)
- 10) 竹内崇他、“ラクトフェリン2007：ラクトフェリン研究の新たな展開と応用へのメッセージ”、118-122頁、第2回ラクトフェリンフォーラム実行委員会編集、日本医学館(2007)
- 11) 前田隆子、原田悦守、母性衛生、**48**(2), 239-245 (2007)
- 12) 石井利明他、医学検査、**52**(8), 1053-1057 (2003)