

PEG-ラクトフェリン

腸溶性ラクトフェリン研究会
理事 山崎 昌次郎

1. 医薬品への期待高まるラクトフェリン

ラクトフェリン (LF) は、1939年に「牛乳の赤いたんぱく質」として、スウェーデンの学者が発見した。それはヒトを含む哺乳類の乳、分泌液、成熟好中球の顆粒に含まれる分子量約8万ダルトンのたんぱく質で、2~3個のシアル酸からなる糖鎖(分子量の10%程度)を持っている。



図1. ヒト・ラクトフェリンの構造

1966年、ニュージーランド、マッセイ大E. ベーカー教授(当時)提供

LFは、血液中の鉄たんぱくであるトランスフェリンと同様、 Fe^{3+} を二個分子内にキレートする性質がある。原始的な生命が誕生した35億年前の地球の酸素濃度がゼロで、環境に多量のFeイオンが存在したと言われている。Feイオンは不飽和脂肪酸、糖類と共存すると急速に連鎖反応を起こし脂肪酸を過酸化する猛毒である。一方、ヘモグロビンに含まれる鉄は生命維持に必須だ。

トランスフェリン-LF属たんぱく質は、毒性が強い鉄イオンを飼い慣らすために生まれた起源の古いたんぱく質なのであろう。その証拠には成長に必要な鉄を乳児に与える母乳は、鉄飽和度が5~7%、牛乳でも11~15%であるに対し、成熟好中球のLFは0%で、感染症や組織の壊死で遊離の Fe^{3+} が体内の微少環境に放出されるや否や、即刻、好中球顆粒から放出され周囲の微小環境から Fe^{3+} をキレートして有害な影響をマスクする体制が整っている。LFの Fe^{3+} に対する親和性はトランスフェリンと比べて300倍強く、両者を一緒にインキュベートするとトランスフェリンの Fe^{3+} はすべてLFに移行する。したがって、感染局所のように Fe^{3+} が病原微生物の増殖を促し致命的に作用する場合、 Fe^{3+} をキレートして有害な影響を除去するのはトランスフェリンではなくLFの役割である。

すでに、ヒト(図1)、ウシ、ラクダ、ウマのLFは、結晶X線回折により構造が決まっている。それによると、LFは700以上のアミノ酸が結合した一本鎖のポリペプチドで、ほぼ同じ数のアミノ酸からなるC末端とN末端はジスルフィド結合(-S-S-)でほぼ同じ大きさの球状に丸まり、二つの球体が団子状にくっついた構造をしている。LFには34から36のシステインが含まれているためである。二つの球体の中心には、キレート結合により Fe^{3+} が固定される。

LFは哺乳動物の乳、粘膜を被覆する粘液に含まれており、とくにヒトでは前記したように初乳に多く、新生児が母乳から摂取するLF量は、一日あたり5~7gにも達する。出生直後の人類は、LFにもっとも依存度が高い動物種の一つである。

LF (LF) は、鉄イオン結合性の分子量約8万の塩基性糖タンパク質で、食品企業を中心に牛乳由来ウシLFが健康食品として実用化されている。昨今、健康食品の有効性、安全性が問題になっており、LFの優れた薬効を生活習慣病や疼痛管理に生かすには、医学的、科学的に薬効及び安全性が保証された医薬品としての開発が望まれている。

2. 医薬品としてのLF改善点

しかしながら、創薬シーズとしてのLFには改善すべき点がいくつかある。最も大きな問題は、体内における**血中半減期**が極めて短いという点である。LFは糖タンパク質であるため、プロテアーゼによる分解を受けやすいということと、糖鎖部分に存在するフコースを認識する肝臓の排除機構が働いて、天然型LFの血中での半減期は3分以内といわれている。

二つ目の問題は、経口的に摂取されたLFは胃で**ペプシン消化**を受け易いという問題があり、ヒト胃内の半減期は7～8分といわれている。しかし、当研究会が実験したところによると、pH 3.0で基質のLF濃度が2 mg/ml、ペプシンが40 ng/ml、温度37°Cの条件における分解速度はきわめて迅速で、LF濃度は5分後とに1/10に減少するほどであった。食物は胃に2時間ほど滞留するので食後に摂取したLFは超微量の1/10²⁴しか残存しない。これから明らかなのは、胃でペプシン消化を受ける形でLFを摂取しても、ビフテキを食べているのと同じでLFに特有の生理活性の発現は期待できないことである。LFは必須アミノ酸と含硫アミノ酸が豊富なので、優れた蛋白源であることは確かである。栄養価が優れたたんぱく質を摂取したいならば、わざわざ高価なLFでなくても鶏卵、肉類、大豆等々、廉価な蛋白源がいくらかでもある。乳児で発現するLFの生理効果を成人にも期待するなら、胃におけるペプシンの分解を避け丸ごとのLF分子が小腸に到達することが必須である。

従来から、LFのペプシン分解産物であるラクトフェリシンという塩基性ペプチド断片に抗菌作用があることが知られており、LFは分解されて生物活性を発揮するという考え方もあった。抗菌物質としてラクトフェリシンをしらべると、おかしなことに気付く。まず、最初にラクトフェリシン程度の抗菌活性があれば、マウスに病原菌を感染させて発症させる実験的な敗血症に効果があるはずだが、感染防御効果はいっさいない。第二にラクトフェリシンは、病原性細菌の抗生物質に対する感受性を検定する **nutrient broth** では抗菌活性がない。また、LFが胃で消化されて生じたラクトフェリシンが十二指腸に流入すると、酸性の消化物はプロテアーゼを含む腸液を吹き掛けられて急速に中和される。その過程でペプチドは、吸収されるいとまがあればこそ、瞬時にジペプチド、トリペプチド或いはアミノ酸に分解されるはずである。ラクトフェリシンが丸ごと吸収され、体内で抗菌活性を呈することはありえない。

この考え方の背景には、経口的に摂取されたLFがどうしてもヒトの血中で検出できない、つまりインタクトな丸ごとのLF分子のままでは吸収されないのではないかという疑

間があった。これに対して、鳥取大学では、ブタを用いた実験でLFが腸管上皮細胞から取り込まれて血中及び脳脊髄液中に移行することを1999年に報告しており、また、LF腸溶錠を経口摂取した場合、ヒト血中に微量ながらLFが検出されることを世界で初めて示した(文献1)。その後の研究の結果、LFは腸管パイエル板にあるM細胞からリセプター介在性に取り込まれること、その取り込みルートは門脈ではなくリンパ管を介して取り込まれ、血中に移行することを、高度な動物実験技術を駆使して明確に示した(文献2)。この結果、腸管からのLFの体内移行については科学的に結着がついたといえる。生理活性タンパク質であるLFに対するリセプターは小腸に多いが、それ以外の骨格筋、心臓、脳、肝臓、すい臓、胸腺、脾臓、リンパ節、外分泌腺、精巣、卵巣などほぼ全身の組織に発現されている。すなわち当然のことであるが、LF本来の生理活性に基づく薬効発現には、分解されていないインタクトなLF分子がターゲット組織のリセプターに結合する必要がある。従って、経口ルートで投与する場合は、**ペプシン耐性**を付与するか、**腸溶製剤**として丸ごとの分子を取り込み部位である腸管まで届けることが重要であることがはっきりした。勿論、用途、病状によっては、注射剤として使用することもできるようにする必要がある。

三つ目の問題は、現在、食品用に市販されているLFは牛乳から製造されており、ヒトに対して異種タンパク質であるという点にある。従来から、ウシLF粉末の安全性は十分に確認されており、育児用粉ミルクにも添加が認められている。牛乳アレルギーは、鶏卵アレルギーと比べ出現頻度が1/10で、しかも、アレルギーは母乳には存在せず、牛乳のホエイ蛋白の一つ、βラクトグロブリンの場合がほとんどで、牛乳LFがアレルギーになったアナフィラキシーショックは報告がない。日韓両国で育児用調製粉乳にLFが添加されて20年以上が経過し、数百万の乳児がLF含有の粉ミルクを摂取している。特に、経口摂取したLFは、免疫系を細胞性免疫優位(Th1 shift)を起こさせ、免疫グロブリンEの産生を抑制するだけに、今後ともアナフィラキシーショックとは無縁な異種たんぱく質であり続けるものと思われる。

3. タンパク質のPEG化

これらの問題点を解決する有力な手段として、近年、**タンパク質のPEG化**（英語では、PEGylation という言葉も生まれている）がよく用いられる。すなわち、PEG(poly(ethylene glycol)ポリマー)をタンパク質のようなマクロ分子（治療用タンパク分子）に共有結合させることで、抗原性をマスクしたり、血中半減期を極端に延長させたりするなどの利点をもつ。現在までに医薬品として市場で販売されるものに以下のような製品であり、この他数多くの開発製品もある。

表1. 市場で販売される PEG 化医薬品（文献3）

PEG 化医薬品名	製造メーカー	適応症
PEGASYS(PEG-IFN- α)	Hoffman-La Roche	C 型肝炎
Pegintron(PEG-IFN- α)	Schering-Plough	C 型肝炎
Oncaspar(PEG-Asparaginase)	Enzon	ALL(急性白血病)
Neulasta(PEG-rmet-hGCSF*)	Amgen	癌化学療法
Doxil(PEG-liposome(doxorubicin))	Sequus	癌化学療法

* recombinant methionyl human granulocyte colony-stimulating factor

例えば、インターフェロンはPEG化によって生物活性が約1/10に低下するものの、体内寿命が約70倍に延びて、結果として総合的な治療効果が大幅に改善され、C型肝炎の治療に役立っている。PEG化とは、高分子のポリエチレングリコールの末端にN-ヒドロオキシスクシンイミド(NHS)基のような活性基を付けてタンパク質分子表面に存在するリジンの ϵ -アミノ基と反応させる技術で、PEG鎖でタンパク質の分子表面を部分的に覆うことにより、抗原性を低下させプロテアーゼの作用を受けにくくする、或いは、肝臓の排除機構をすり抜けるようにして体内寿命を延ばすなどのメリットがある。タンパク質のPEG化という概念自体は、白血病治療薬としてアスパラギナーゼのPEG化が成功して以来、古い歴史があるが、当時に比べてPEG化試薬自体の構造（活性基のタイプ、分子の大きさと分子量分布、分岐型の開発など）の改良がなされ、反応部位の制御についても技術的に大きく進歩している。LFに関しても、1983年の古い文献にPEG-LFを合成し、LFの体内寿命が5~20倍延長したという報告（文献4）があるが、当時のPEG化技術に比べて、最近では優れたPEG化試薬が開発されており、新規な構造で、より優れた物性を有するPEG-LFを開発できると考えられている。

4. PEG-LF の研究開発

東京工科大学佐藤敦教授のグループでは、次世代タンパク質医薬品創出を目指した、創薬シーズとしての**PEG-LF**に関する研究を進めている⁽⁵⁾。佐藤等の**PEG-LF**はペプシンやトリプシンなどのプロテアーゼに対する抵抗性も認められており、最も重要な生物活性である鉄キレート能も保存されているという結果が得られている。

表2 PEG-LF の鉄キレート活性

Protein	Bound Fe (ng/mg protein)		(%)
	Fe-free	Fe-bound	
bLF	79.7	913.4	100.0
20k-PEG-bLf	125.6	1146.6	122.5
40k-PEG-bLf	128.9	1094.3	115.8
BSA (control)	67.0	119.6	6.3

表2に示すように20K-PEG-bLFと40-K-PEG-bLFは100%のFe³⁺に対するキレーション活性を保持している。表2で鉄フリーという表現について若干の説明が

必要である。もともと牛乳から単離された天然型LFは、鉄キレーション能が飽和された場合を100%とすると、10%~15%の三価鉄イオンをキレート結合している。Fe-boundは鉄イオンを飽和させた場合におけるmg蛋白あたりのFe³⁺保持量を示す。したがって、鉄イオン不飽和の状態における鉄飽和度は、bLFが8.7%、20k-PEG-bLFが11.0%、40k-PEG-bLFが11.8%である。

図2にPEG-LFのペプシン消化に対する抵抗性を示す。pH 3.0において重量比で基質の

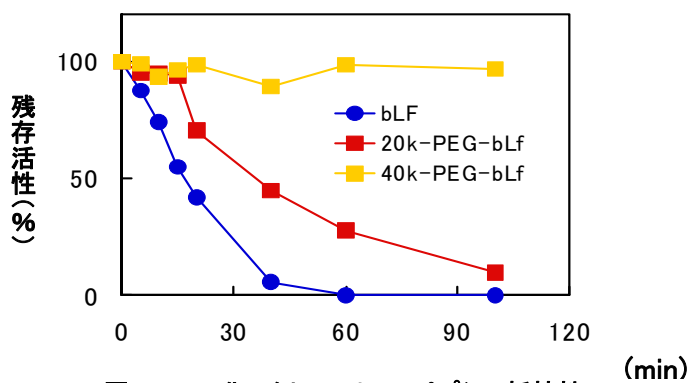


図2. PEG化ラクトフェリンのペプシン抵抗性

5万分の1のペプシン存在下にPEG-bLFを消化し、残存量を図示すると、bLFは60分でほぼ感染に消失するのに対し、40k-PEG-bLFは完全にペプシン抵抗性であり、20K-PEG-bLFの抵抗性は両者の中間にあり、60分後でも25%が残存している。つまり、予期したとおりPEG化は酸性条件でペプシンに対する

抵抗性を増大させる結果が得られた。

図3は20k-PEG-bLF (30mg/kg)を胃内に投与し血中濃度を測定した結果を示す。図から明らかなようにPEG-bLFの血中濃度は、bLFを同量~10倍量投与した場合と比べ遥かに高く、小腸からの吸収が良好であることを示唆した。さらに注目すべきは、同量のbLF腸溶製剤を投与した場合の血中濃度と比べても、各時点におけるPEG-bLFの血中濃度は2倍以上高く、腸溶製剤の血中濃度は投与4時間後には低下し始めるのに対し、血中濃度が上昇し続けることである。つまり、ラクトフェリンもインターフェロンと同様に生体内に

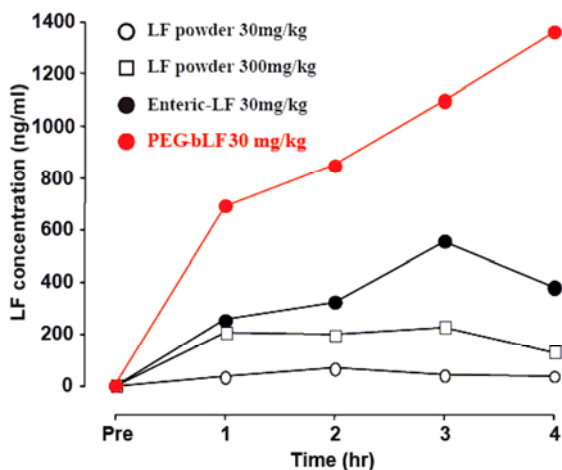


図 3. 20k-PEG-bLF の血中濃度推移

おける半減期が大きく延長するので、より高い効果が期待できるようになった。

図 4 は 20k-PEG-bLF の半減期及び AUC を測定した結果を示した。図 3 に実験とは条件が異なり、この実験では胃内におけるラクトフェリンの分解を避けるため、静脈内投与して、採血して LF 濃度を ELISA 法で測定した。したがって、投与量が 1 mg/kg のように低くても、血中から LF は十分に検出できる。半減期は bLF が 7.8 分～14.7 分だったのに対し、PEG-bLF のそれは 42.4 分と 5～2.8 倍延長した。さ

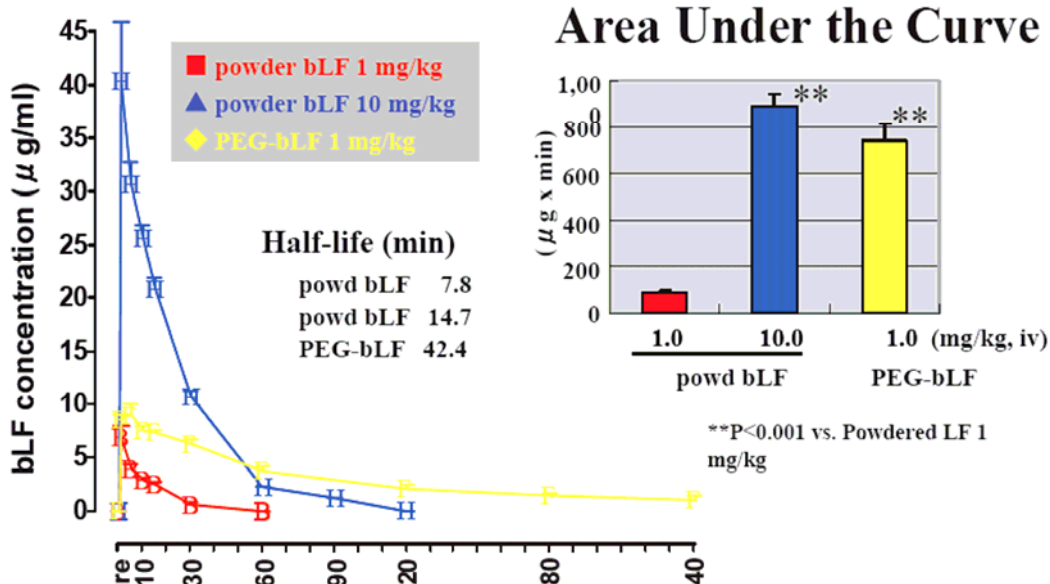


図 4. 20k-PEG-bLD の半減期と AUC

らに、AUC は投与量が同じ場合と比べ 9.4 倍、投与量が 10 倍の場合と比べほぼ同等の AUC を示した。bLF に限らずラクトフェリンは、他のサイトカインのような副作用はない。それだからこそ、乳に分泌され乳児の健康を守ってきたのであろう。これまでの研究から経口投与でもわれわれ成人がラクトフェリンの恩恵を受けることができることがわかってきた。ラクトフェリンは、脂質代謝異常、メタボリック症候群、心身のストレス、ウイルス性肝炎、がん、アレルギーと膠原病などの免疫異常、神経変性疾患、ウイルス及び病原微生物感染症の治療/予防に大きな役割を果たすことが期待される。LF に PEG を結合させた新規の誘導体 (PEG-LF) は、LF の泣き所である“ペプシン”に対し抵抗性であること、及び LF の生体内寿命を約 10 倍延長させること、生物活性は PEG 化してもほぼ 100% 残存していることなどが明らかになった。鎮痛作用、肝保護作用は PEG 化で増強される。

PEG-LF は適切な治療薬がない難病の治療薬候補として大いに期待できる。臨床試験に入るための薬効薬理試験、安全性試験、製剤安定性試験などの前臨床試験が必要である。

薬事法における医薬品の3本柱は「有効性」「安全性」「品質」であり、創薬ニーズとして期待の高いPEG-LFは、LFを含めたいまままでの研究成果により「有効性」「安全性」については、極めて高いレベルを示すと予測されるが、「品質」に関してはまだまだ解決しなければ問題があり、今後化学的にも十分な検討が必要である。

また、今回触れなかったが、PEG-LF研究成果はウシLFを用いての結果である。今後医薬品として、抗原性の低減化を目指すためにもヒトLFを、しかもLF糖鎖構造からも動物培養細胞由来の遺伝子組換え型ヒトLFを用いることが極めて望ましいと思われる。PEG-LFの論文を読んだ米国化学会の事務局は、次のようなコメントを寄せている。

ここの結びの言葉を入れてください。

引用文献

- (1) 第6回LF国際会議、2003年
- (2) T. Takeuchi et al., *Exp. Physiol.* 89(3): 263-270 (2004)
- (3) <http://en.wikipedia.org/wiki/PEGylation>
- (4) C. O. Beauchamp et al. *Anal. Biochem.* 131: 25-33 (1983)
- (5) Y. Nojima et al., *Bioconjugate Chem.*, 19(11): 2253-2259 (2008)

