

第7回ラクトフェリン国際会議に参加して

清水洋彦

活発なラクトフェリン研究

ラクトフェリン（以下、LFと略す場合がある）は、母乳、特に初乳に多く含まれるが、成人においても涙液、唾液、腠液その他の外分泌液や好中球に含まれている鉄結合性の生理活性タンパク質である。体内のLFは、大部分がアポ型で鉄イオンが結合していない状態であるが、3価の鉄イオンに出会うと、トランスフェリンの約300倍の強さでキレート結合し、鉄イオンが触媒する酸化反応を防止する。LFは、この鉄代謝調節作用を中心に、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、様々な作用のある多機能性タンパク質であり、健康サプリメント或いは医薬品シーズとして近年注目されている。

これまでに発表されたLFに関する学術論文数を Pub Med で調べると 4600 報(2005.12)を超え、そのうち約半数はこの10年間に発表されたものである。昨今、流行りのコエンザイム Q10 が 1400 報であることを考えると、LFに関する研究が極めて活発であることが分かる。

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、International Conference on Lactoferrin –Structure, Function & Applications –という名前の国際会議が開催されており、最初の会議が1993年にハワイで開催されて以来、LFの構造、機能、及び応用といった幅広い分野、領域の世界中の研究者が一堂に介する研究討論の場となっている。第7回会議は、開催地が一巡して、2005年10月16日～19日、ハワイ州ホノルル市のワイキキビーチ近くのマリ奥特リゾートホテルで開催された。近くのレストランから見るワイキキビーチの夕陽はさすがに印象に残る美しさであった。

写真1. ワイキキビーチの夕陽（鳥取大学名誉教授原田悦守先生撮影）

学会事務局の発表によると参加者は全体で119名、日本以外から72名、日本からは47名（全体の約40%）の参加があった。その内、企業からの参加者は全体、日本ともに約40%であり、LFに対する産業界の関心の強さがうかがえる。スポンサー企業としては、これまでLF実用化研究を引っ張ってきた森永乳業、独自に腸溶性LF事業に取り組んでいるNRLファーマなどの日本企業や、Ventria Bioscience（米、コメを宿主とする遺伝子組換えヒト型LFを製造販売）、DMV International（オランダ、ミルク由来ウシLFを製造販売）、MG Nutritionals（オーストラリア、ミルク由来ウシLFを製造販売）、Pharming（オランダ、ウシを宿主とする遺伝子組換えヒト型LFを製造販売）など、LF原料の生産企業などが目立つ。特に、Ventria Bioscience 社や Pharming 社の出展は初めてで、コメやウシを宿主とする遺伝子組換えヒト型LFの生産技術が研究段階を終えて、ようやく実用化段階に移行したことを示している。

発表は、基礎から応用まで、5つのセッションに分かれて、口頭発表が全部で41演題（日本から12演題）、ポスター発表が37題（日本から18題）であった。

写真2. ポスターセッション風景（北海道大学教授・島崎敬一先生撮影）

筆者は、NEDOからの委託でLF実用化研究の最新動向を調査する目的で、鳥取大学名誉教授・原田悦守先生とともに会議に参加したので、ハワイ会議で報告されたトピックスを拾いながら、LFに関心のある読者の参考としたい。今回の調査結果は、H17年度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ー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（東京工科大学、鳥取大学、酪農学園大学による共同開発、よこはまティーエールオー株式会社が統括）に活かされることになっている。

ラクトフェリンは本当に効果があるのか？

LFの効能・効果については細胞レベル、動物レベルで多くの興味深いデータが得られており、食品素材、健康サプリメントとしての魅力は素晴らしく、研究者の関心を惹きつけてきた。しかしながら、牛乳由来成分という生い立ちから食品として開発されたきたため、重要な生理活性タンパク質であるにも関わらず、バイオ医薬品開発ブームに取り残され、薬理作用、体内移行・分布（いわゆるADME）、製剤技術等の基礎研究が遅れた面がある。リセプターがクローニングされたのが2001年のことであり、後述するように、経口摂取された分子量約8万のタンパク質が腸管から体内に移行するかどうかという本質的な問題について結着がついたのがごく最近のことで、体内動態についてはまだまだ分からないことが多い。応用が先走ってそういう研究が十分に蓄積されていないのが現状である。LFを1-2%含有する飼料で動物を飼育すると様々な効果が認められるのに、いざきちんとした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、食品に添加されたり、LF錠菓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。

最近では、大学医学部などの専門家と話をしても、LFは本当に効くのかということが話題になることがある。ところが、今回の会議で最も注目された発表が、遺伝子組換えヒト型LF（rhLF、アスペルギルス属のかびの一種を宿主として生産）を用いて臨床開発に取り組んでいるアジェニックス社（米国）の臨床試験成功の発表であった。同社では、rhLFの溶液製剤を使用して、非小細胞肺癌患者100名を2群に分け、シスプラチンによる標準化学療法に追加して、rhLF投与群とプラセボ群を比較したフェーズII臨床試験の結果、部分寛解と完全寛解の合計は、プラセボ群29%に対して、rhLFの併用で47%に向上したという結果が得られ、現在、フェーズIII臨床試験を計画中とのことである。筆者も何回かテキサスにある同社を訪問し、LFは胃で分解するから腸溶製剤にすべきではないかという提案をしたが、理屈は分かるがFDAの承認を得て実施している臨床試験であり、試験途中での処方変更は難しいので、現行処方（溶液製剤）を進めたいとのことであった。懇親会の席でも、開発責任者のペトラック博士と同席してじっくり話をする機会があり、長年の開発努力の成果がようやく実を結びつつあることをねぎらったところ、大変嬉しそうで、この投与量でも生産性、経済性に問題ないとのことであった。重要な点は、LF投与量が1日あたり10-15gであり、日本で実施されている臨床試験よりも数倍多いことである。動物実験で効果が認められる1-2%のLFを含有する飼料というのは、体重換算すると、300-600mg/kgと言われており、60kgのヒトに換算すると1日当たり18-36gに相当する。アジェニックス社の結果もほぼこれに符合する。これだけ大量に投与すれば、一部胃での消化分解を免れたLFが腸まで届いて薬効を発揮するものと考えられる。ペトラック博士は投与量を

もっと減らせると言うと言っていたが、効果という観点からは、もっと増やすか、剤形を検討すべきであるとする。小型げっ歯類動物での薬効量をヒトに外挿する場合、通常は1/10と言われているが、LFの場合は胃での消化の問題が大きいのであろう。

一方、昭和大学の二つの研究グループから、1日投与量200-600mgのLF腸溶製剤の投与で、歯周病、ドライマウスに著効が認められたこと（歯学部・玉置ら）、妊婦の便秘の改善に有効であったこと（医学部・大槻ら）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慶応大学医学部・坪田らのシェーグレン症候群による重症ドライアイに対する臨床効果も含め、LF腸溶製剤を用いた臨床試験で明らかな効果が次々と確認されつつある。

これまで、LFは本当に効くのかという疑問すら投げかけられていた臨床応用面で、アジェニックス社のように、兎に角大量に投与すれば（十分ではないにしても）臨床効果があること、腸溶製剤にして腸管からきちんと体内に取り込ませれば、明確な薬効が確認できることが分かってきたことは、今後のLFの臨床応用に大きな期待を持たせるものである。

ラクトフェリンの体内移行

これまでの臨床試験の結果から、LF腸溶錠を用いると、1日あたり200-450mgで十分に臨床効果が認められており、腸溶性であることのメリットは明らかである。しかしながら、LFのような高分子タンパク質が本当に腸管から取り込まれて血中に移行するかどうかについては、専門家の間でも意見が分かれている。ラットを用いた実験で、薬物が腸管から吸収される際の主ルートである門脈血を調べたところ、LFが検出されないことから、LFはそのままの形では血中に取り込まれず、LF分解物がLFの作用のかなりの部分を担っているのではないかという考え方がある一方で、鳥取大学・原田らは、以前から乳タンパク質成分の腸管からの取込みについて研究しており、1999年にLFが腸管から取り込まれ、血中及び脳脊髄液に移行することを仔ブタを使った実験で証明している。

このLFの体内移行に関する食い違いの原因について、原田らは高度な動物実験技術を駆使して科学的に結着をつけ、今回の会議でその概要を発表した。すなわち、LFを十二指腸内に投与したラットのリンパ管から採取したリンパ液中にLFが検出されること、このリンパ液を抜き取ると血中にLFが検出されなくなることから、LFは門脈経由ではなく、まず腸管からリンパ管に取り込まれ、やがて体内循環に入って血中に移行するという事を明確に証明した。さらに、最近開発されたLFの腸溶性顆粒を用いてリンパ液への取り込みを調べたところ、ラットではLF粉末に比べて腸溶性顆粒は10~20倍効率よく取り込まれることも分かった。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推測される。

図1. リンパ管を介するLFの体内移行

図2. 腸溶性LFとLF粉末との体内移行

ラクトフェリンの新規作用

LFは様々な生理作用を示す多機能性タンパク質であることが知られているが、最近、脂質代謝改善作用、鎮痛・抗不安作用、抗酸化・アンチエイジング作用など、新たな生理作用が次々と見出されている。今回の会議で注目されたトピックスを以下に紹介する。

【骨量増加作用】

ニュージーランド、オークランド大学の研究グループからLFに骨成長（骨量増加）作用があることが報告された。骨量の調節は、骨を作る骨芽細胞と骨を溶かす破骨細胞の作用の動的なバランスによってなされている。コーニッシュ博士らは、LFが1-10 μ g/mlの濃度で骨芽細胞の増殖を促進し、破骨細胞を減らすこと、この作用はLDL受容体関連タンパク質によるシグナル伝達と関わっていることを明らかにした。また、今回の会議では、LFの様々な作用において、鉄結合能或いは結合鉄の関与が議論されたが、この骨量増加作用においては鉄結合の影響がなく、鉄を結合していないアポ型LFに作用があることが報告された。

【脂質代謝改善作用】

韓国の研究グループから、肥満マウスのモデル動物で、10mg/日（約500mg/kg）のLF摂取で体重増加が抑制されること、コレステロール低下が認められることなどが報告された。これまでLFの脂質代謝改善作用は鳥取大学・原田らの研究グループが発見し、報告してきたが、このように他の研究グループによってもその作用が追試、確認された事によってLFの重要な生理作用の一つとして、脂質代謝改善作用が注目されるようになるものと考ええる。

【鎮痛・抗ストレス作用】

鳥取大学・竹内らは、各種疼痛モデルでのLFの鎮痛・抗不安作用について、鎮痛作用のメカニズムにまで踏み込んだ詳細な発表を行った。即ち、①LFは μ -オピオイドの作用を選択的に増強することにより、単独でも強い鎮痛作用を示すこと、②モルヒネと併用するとモルヒネの作用を50~100倍増強すること、③モルヒネのような薬剤耐性を示さないこと、④抗不安・抗ストレス作用があり、これも μ -オピオイド関与であること、⑤その作用メカニズムとして、LFが神経組織のNO合成酵素を活性化して、生成するNOがグアニルサイ클ラーゼに働いて μ -オピオイドのシグナル伝達を増強すると考えられることなどを発表し、注目された。

【アンチエイジングとラクトフェリン】

最近、生活習慣病の多くが活性酸素やそれに由来するフリーラジカル・過酸化脂質などによる酸化ストレスが発症の要因になっていることが指摘されている。生きるためには酸素が必要であり、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。

米国では早くから鉄をはじめとする重金属イオンによる健康への悪影響が注目され、若返りのためのキレーション療法、抗酸化性サプリメントの摂取が流行っている。ところが米国における複数の大規模な二重盲検臨床試験によって、必ずしも抗酸化物質の摂取が健康に良いという証拠は得られないということが最近明らかになってきて、関連業界で論議を呼んでいる。

酸化ストレスの元凶は鉄イオンの触媒によって生成するヒドロキシラジカルであり、LFは3価の鉄イオンを強くキレート結合する性質があり、このヒドロキシラジカルの生成を抑える作用があり、抗酸化ストレス・アンチエイジング作用が期待できる。

今回の会議で、名古屋市立大・津田研究室からLFの新アイソフォーム、 γ -LFに関する発表があった。この γ -LFを強制的に発現させたA549細胞は、フェントン反応によるヒドロキシラジカル産生が阻害されることにより、ブレオマイシンによるDNA損傷作用が抑制されることが分かった。研究は始まったばかりであるが、LFの本来的な作用である鉄キレートによる抗酸化ストレス作用が今後注目される。

【LF由来の新規抗菌ペプチド】

LFのアミノ末端由来の塩基性ペプチド、ラクトフェリシンに強い抗菌作用があることが注目され、この抗菌性ペプチドの構造をベースにして強力な抗菌剤を開発しようという試みがなされてきたが、目立った成果が得られていない。今回、オランダ、ライデン大学のニベリング博士らは、hLFのN末1~11番目からなる抗菌性ペプチドの静脈内投与(40 μ g/kg)がカンジダ感染症に有効であること、LF分子と同様にLPS刺激によるTNF α 産生を抑制し、IL-10産生を増強するというデュアルな作用があることなどを発表した。LFに由来する特異的な構造の部分ペプチドに、抗菌作用以外にLFの多機能性の特徴であるサイトカイン調節作用があることは注目に値する。さらに、アポ型LFが細菌表面のセリンプロテアーゼにより切断されて抗菌性ペプチドが生成して抗菌作用を発揮するが、ホロ型はプロテアーゼによる切断を受けず、抗菌性ペプチドが産生されないという発表もあり、LFの生物活性と鉄結合能との関連がここでも注目された。

また、LF由来の新規な抗菌ペプチドとして、ラクトフェリシンの近傍に位置するNローブ、268~284番目からなる塩基性ペプチド、ラクトフェランピン(Lactoferrampin)の発見の発表があり、今後、創薬基盤技術であるCADD技術(コンピューター支援薬物設計技術)の発展とも相まって、LFの部分構造をリード化合物とする創薬の試みが再び活発に展開される可能性がある。

ラクトフェリンの作用メカニズム

2001年にLFリセプター(LFR)のクローニングを報告したカリフォルニア大学レナーダル博士らは、その後の研究成果として、LFRがヒトとマウスの小腸で確認され、LFとLFRが細胞内の核内に共存すること、発育初期にはLFRを介して鉄が輸送されること、さらに、LFRに対するLFの結合部位に関する解析結果を報告した。LF及びLFと類似の鉄運搬体であるトランスフェリン(Tf)の部分ペプチドを種々作成し、LFRとの結合、核内移行などについて検討した結果、LFRとLFのN1-1部分が結合して核内に移行すること、Tfは核内に移行しないことが分かった。このことは、LFがLFRと結合して細胞膜から細胞内に取り込まれ、核内に移行して遺伝子の転写調節などの作用を発揮することを示唆している。

今回の会議で、LFは核内移行シグナル(ヒトLFの場合、GRRRRという塩基性のアミノ酸配列)を有しており、確かに細胞の核に運ばれて遺伝子の発現を調節していることがはっきりしてきた。特に、韓国高麗大学の崔博士らは広範、かつ、精密な実験から、LFがAP-1やNF κ Bの活性化を介して一連の細胞内転写シグナルを調節している転写調節因子であることを明確に示し、注目された。

図3. L Fによる細胞内転写シグナル調節 (Dr. Choi 提供)

北海道大学教授・島崎敬一先生は、これらのL Fの多面的な作用を整理して考えるためのモデルを考案されており、2003年のイタリア会議で提案されたスイスナイフ・モデルとピリヤード・モデルに加えて、今回、キャリアー・モデルを新たに提案された。L F研究のまとめ役というお立場から、様々な立場、分野の研究者が共通の土俵で議論できるベースを提供しようという試みであり、今回、特別にJMSのために日本語版を作成いただいたのでご紹介させていただくとともに、その労に感謝したい。

図4. L Fの作用メカニズムのモデル (島崎先生提供)

今後の展開

L Fの実用化研究は1980年代はじめから本格化したが、すでに述べたように、L Fは本当に効くのか、L Fの多機能性を説明できる作用メカニズムは何か、L Fの体内動態はどうなっているのか、本当に体内に取り込まれるのか、脳や心臓にあるL FリセプターはL Fのどういう機能を担っているのか、ペプシン分解物の作用はL Fの作用をどこまで代替し得るのかなど、山積する疑問の前に、かえって混乱を増している感があった。

そういう状況の中で、2003年のイタリア会議はやや中弛みの感があったが、今回のハワイ会議でL Fの基礎、応用、臨床研究のそれぞれの分野で様々な研究成果が報告され、タンパク質医薬品の開発ブームに取り残された生理活性タンパク質、L Fの限りないポテンシャルが明らかになりつつあり、L F実用化研究が新しい局面を迎えようとしている。

特に、L Fが究極のアンチエイジング物質として活力ある高齢化社会を担う健康サプリメントとして期待される一方、サプリメント用途とは差別化されたL F素材で、適切な治療法のない難病の治療薬或いは生活習慣病治療薬シーズとしてのラクトフェリンに対する期待が是非現実のものになるように微力ながら頑張りたいものである。

以上

(参考文献・・・更新予定)

- 1) 島崎敬一、化学と生物 **38**(3), 167-170 (2000)
- 2) Shimizu, H., BioMetals **17**: 343-347 (2004)
- 3) 佐伯めぐみ他、第13回日本シェーグレン症候群研究会 (2004. 9, 佐賀)
- 4) 木元博史、ミルクサイエンス **53**(4), 313-314 (2004)
- 5) Harada, E., et al., Biol Neonate **76**: 33-43 (1999)
- 6) Takeuchi, T., et al., Exp Physiol **89**: 263-270 (2004)
- 7) Takeuchi, T., et al., Br J Nutrition **91**:533-538 (2004)
- 8) 木元博史、Prog Med **23**(5), 1519-1523 (2003)

- 9) 原田悦守、慢性疼痛 **23**(1)、9-23 (2004)
- 10) Hayashida, K., et al., Brain Res **965**, 239-245 (2003)
- 11) Hayashida, K., et al., Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **285**: R306-R312 (2003)
- 12) Takeuchi, T., et al., Brain Res **979**: 216-224 (2003)
- 13) Taylor, H.R., et al., BMJ **325**(7354): 11 (2002)
- 14) Bairati, I., et al., J Natl Cancer Inst **97**(7): 481-488 (2005)
- 15) 山下靖雄、伊藤圭子、第 110 回日本解剖学会総会 (2005.3, 富山)