

第9回ラクトフェリン国際会議参加報告

腸溶性ラクトフェリン研究会理事
桑田 英文

1. 会議の背景と歴史

2009年10月18日～22日の5日間、中国北京で第9回国際ラクトフェリン(LF)会議が開かれた。LFの研究は1939年にSorensenらが乳中に同定したのが始まりである。ある乳業会社では1980年代からこのタンパク質を育児用ミルクに応用していたが、近年では育児用の用途に留まらず発がん抑制や骨粗しょう症の予防など広くその応用が注目されている。LFの基礎とその応用を探っていた研究者ら

により1991年からはこのタンパク質にフォーカスした国際ラクトフェリン会議が隔年で開催されている。この会議がアジアで開催されるのは1999年に札幌で開催されて以来である。表1に現在まで開催された会議の開催地を記載した。

哺乳類に共通するタンパク質は約3000種類であるが、そのうち単一のタンパク質に焦点を絞った学会が20年近く続いているのは、おそらくこのLFが唯一のものであろう。初期からLF国際学会を率いてきた先生曰く「一つのタンパク質だけを話題にする学会がいつまで続く心配もあったが、今回の学会でも全然心配はない」とのことである。これはLFが多機能タンパク質で様々な機能が見つかり、研究者を魅了し続けていることもさることながら、先進的な企業が早くに工業的な精製法を確立させ、大規模に応用してきたこととも無縁ではないだろう。今回の学会でも初期のころからの変わらず会をサポートしている企業に加え、LF

の生産を予定している新たなスポンサーも複数加わって、参加者が200名前後の小さ

表1 国際ラクトフェリン会議の開催地

1993	Honolulu, Hawaii
1995	Honolulu, Hawaii
1997	Le Touquet, France
1999	札幌, 日本
2001	Banff, Canada
2003	Capri, Italy
2005	Honolulu, Hawaii
2007	Nice, France
2009	北京, 中国



図1 国際会議の横断幕

スクリーンの後ろに張られた横断幕は縦4m横10mに及ぶという巨大なものであり、12社がスポンサーとして掲示してあった。ディナータイムの準備中に撮影したため、手前に飾り付けたテーブルが見える。



図2 会議の口頭発表の様子

参加者は200名弱であった。

な学会にも関わらず、会の運営は比較的潤沢さが見て取れた(図1、2)。

2. ヒト LF の組み換え発現と中国の注力
エレクトロニクスや自動車製造業等の工業分野での中国の躍進が、経済誌等でも盛んに報道されているが、バイオテクノロジー、医薬、及び酪農分野でもそれは著しいようである。学会がこの地で開催されたのは、この分野に対する中国の注力を示すものだろう。LFの組み換え生産技術の開発のみにやや偏っている感があるものの、各国のなかで10演題以上の最大数の発表を行ったのは、他ならぬ中国である。組み換え発現において開発段階を終え実用化に強い自信が伺えたのは上海に拠点をおく、Shanghai Genon Bio-engineering 社である。すでに組み換えた3代目の88匹のヤギを、管理された酪農場で飼育しているという(図3、4)。ブースにおいては、素晴らしいデザインของบริษัท紹介パンフレットとともにバイアルに入った凍結乾燥のヒト LF を無償で配っていた。学会参加者に全てに行き渡るほどのバイアルを用意していたのが、特に印象的であった。その他、中国国内では、中国农业大学の Ning Li らのグループが、 β -ラクトグロブリンを低減化しヒト LF を含む乳、すなわち”ヒト化型乳”を産生するトランスジェニックウシの世界最大規模の飼育施設を報告した(図5)。国外では1990年代から実用化したオランダの Pharming グループ、アメリカではコメに生産させる Ventria Bioscience 社の Ning Huang らのグループが報告を行っていた。これらの技術は十分な量の LF を生産する技術的課題と初期に評価されるべき安全性の問題



図3 ヒトLF組み換えヤギ
3世代継代して、そのほかの表現系に通常のヤギと特に大きな違いがないことを示していた。

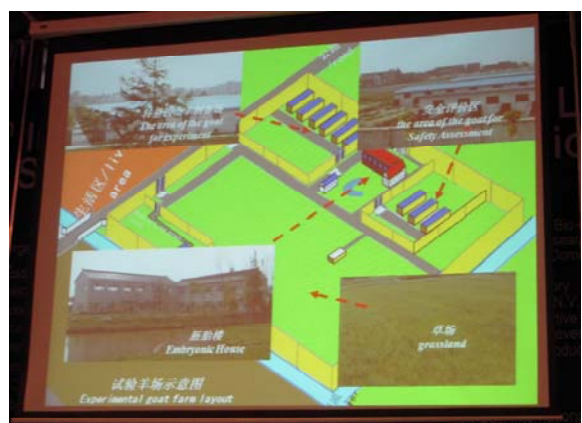


図4 ヒトLF組み換えヤギの飼育施設
管理された飼育環境を示していた。



図5 ヒト化型乳を生産するトランスジェニック牛
世界最大規模で飼育する施設を北京に建設したとのことであった。

をクリアーしており、経口投与での応用を前提とするなら、組み換えタンパク質に対する諸制度と経済性の問題を残すのみといった状況が伺えた。

現在、ウシ LF は世界で毎年 60-80 トン以上が精製され利用されていると考えられる。比較的微量に存在する (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 天然タンパク質で、カラムクロマトグラフィー法で高度に精製されているタンパク質では、LF が他のどのタンパク質よりも既に最大規模のものである。現在もその需要が拡大していることを考え合わせると、組み換え発現したタンパク質の広範囲な利用も LF が最初に始まるのかもしれない。例えば、強力な政治指導により、ある地域のヤギや牛の飼育をヒト型のタンパク質を生産するものに限り、乳をチーズ等の各種乳製品として総合的に利用する方策を取れば、価格においても現在のウシ LF より大幅に安いヒト LF が供給されるだろう。アメリカやヨーロッパの企業では、10 年以上前から組み換えヒト LF を生産していたが、中国の企業がそれよりも早く大規模な実用化に成功する可能性もある。

2. Δ LF と転写調節

デルタ(Δ)LF は、1997 年に発見され、LF と同じ遺伝子からオールタナティブスプライシングにより作られる mRNA より翻訳される LF である。従来 LF は、細胞外に分泌され生体内では他の細胞の成熟や分化に関わり、或いは乳に分泌されたものが乳児の発育に重要な働きをするといった理解がされていたが、 Δ LF は細胞外に分泌されずに核内で遺伝子の転写制御を担っている。今回の学会では、 Δ LF の研究を主導するフランスのグループが 3 演題を発表していた。 Δ LF は S10, S227, S472, T55 の 4 つの部位が O -グリコシド結合糖鎖化され、細胞内の安定性は糖鎖の付加により増すが、転写因子としての活性は低くなるという。 Δ LF のリン酸化は転写因子としての活性を高め、細胞内での安定性を低下させる全く逆の制御もおこなっており、この 2 つの厳密な組み合わせにより、 Δ LF はセルサイクルの調節に関わっているということらしい。

Δ LF の転写調節活性は、現在最もホットな分野の一つだが、これらの研究は実は Δ LF が発見されるよりも前に、細胞外に分泌される LF が遺伝子の転写に関わっていることを 1995 年に Frumanski が最初に報告したのを研究の緒としている。Frumanski が報告したように、細胞外の LF が細胞に取り込まれ、核に輸送され、転写制御に関わるのであれば、例えば細胞の外部からセルサイクルを調節する手段といった細胞工学分野での応用の広がりも期待できるのかもしれない。

3. ラクトフェリンの骨粗鬆症予防とメカニズム

LF の骨成長作用について、LF を経口投与した動物や閉経後の女性による骨密度測定等の臨床試験報告も近年多いが、会議ではそのメカニズムを調べたものが 2 つあった。ひとつは培養細胞を使ったオークランド大学の J. Cornish らで、もう一つは卵巣摘出マウスを使ったフランスの Arnaud Malet らのグループである。ラクトフェリンは

LRP1(LDL receptor-related protein1)に結合し、MAPK を介して、骨芽細胞の増殖を促進しており、ほかのキナーゼ系(PI3 キナーゼ Art 系)を介しても骨芽細胞の survival を調節していることが報告された。卵巣摘出マウスにおいては骨髄中の樹状細胞やB細胞が増加するが、LF投与によりそれが抑えられ、骨髄中及び血漿中の TNF α の濃度も低くなる。ラクトフェリン投与は骨の micro-environment へのリンパ球のリクルートメント、活性化、及びサイトカインの産生を抑制し、骨密度の増殖を促しているという。国内の特定保健用食品においては、免疫系への作用について、LFに限らず今後も表示が認められることは当分の間ないと考えられる。しかし、「閉経後女性の骨密度を高めます」といった効能や「骨粗鬆症の予防に」といった表示であれば特保の対象とする範疇に比較的馴染み易いかもしれない。今回の発表のように骨芽細胞や破骨細胞への作用メカニズムが明らかになってくれば、国内でも応用製品が出てくるかもしれない。

4. 金属吸収とLF

分離された LF を利用する場合、現在は精製したLFをそのまま使う場合が多い。ラクトフェリンはその分子中に2個の金属を結合する構造を持っているが、乳や血漿中から精製したLFはこの結合部位に 10–20%飽和度でしか鉄が結合しておらず、分子のほとんどが鉄を結合しないアポ型である。鉄欠乏性貧血を改善する為の鉄剤の副作用(吐き気、下痢)を低減する為日本国内の乳業会社で1分子のラクトフェリンに70分子の鉄イオンが結合したLFが開発され販売されている。この multiferric ion-bound LF は、LF 分子内の2個の金属結合部位が鉄で飽和したホロ型であり、なお更に分子表面にも鉄が結合したものであると考えられていたが、今回東京大学のタノクラらのグループにより詳細な構造が調べられた。1HNMR, ESR, CD を使った構造解析によりアミノ酸側鎖のカルボキシル基, Fe³⁺, 及び HCO₃ が架橋構造を保つように分子表面を覆っていること、LF 分子が多量体を形成しているという分子モデルが提示された。この multiferric ion-bound LF は鉄剤独特の風味を完全にマスキングしていると同時に、その構造から経口投与した場合に消化酵素への強い耐性があり、LF が鉄の吸収を促進するとともに、消化管粘膜の障害もないという。

金属を結合させたLFについては台湾 Frank Chiahung Mao からもクロムを結合したLFの非アルコール性脂肪性肝炎への応用が発表された。C57BL/6JNar1 及び KK/H1J マウス高脂肪食投与時の影響を報告した。体重、内臓脂肪、脂肪肝の症状において、クロム-LF の群のみが、クロム、LF それぞれの群に比べ改善を示した。経口投与したクロムの吸収効率は極めて低い(数%以下)と言われており、本研究でもクロムの単独投与でクロムの吸収や蓄積は観察できなかったが、クロム-LF を投与した場合には、肝臓、筋肉、脂肪中のクロム濃度の上昇が確認された。クロム-LF の作成法について質問があったが、塩化クロムとラクトフェリンを混ぜるだけで特別なことはし

ていないとのことであった。おそらく大半のLFは1分子中に2分子のクロムを結合したホロ型になっているか、過剰量のクロムを加えているのであれば、先ほどの multiferric ion-bound LF と同じような、クロムに覆われて多量体化した構造をしていると思われる。

本発表の中ではメカニズムは考察されていなかったが、効率よく吸収されたクロムがクロモデュリン(chromodulin)と結合し、それがインスリン受容体に結合し、インスリンの刺激伝達に関与することで、糖代謝を改善し脂肪性肝炎改善作用を示したこと等が考えられる。

5. 脂肪生成抑制作用

LF の脂肪生成抑制作用に関して、臨床試験とメカニズムを調べた報告が日本国内の企業よりなされた。この会社では、歯周病菌のリポポリサッカライド(LPS)の脂質代謝等の全身健康への影響を調べる過程でLFに着目し、すでにボランティアにおいてLFの経口投与が内臓脂肪を低減させることを報告していた。今回二重盲検法による厳密な臨床試験を行い、腸溶性 LF による内臓脂肪の低減を再度確認し、そのメカニズム解明のため、*in vitro* 実験を報告していた。SD-ラットの腸間膜脂肪組織から脂肪細胞(pre-adipocyte)を取り出し、これに LF、トリプシンで消化した LF、或いはペプシンで消化した LF を加えると、LF とトリプシンで消化した LF は脂肪細胞の脂肪蓄積を阻害し、ペプシンで消化した LF にはその作用は見られなかったという。内臓脂肪の低減効果を得るには腸溶性のコーティンにより胃ペプシンからの消化から LF を保護する必要性があること明確に示したデータであった。さらに C/EBP- δ (脂肪細胞分化の初期因子)発現が LF 処理 4hr でダウンレギュレーションされ、C/EBP- α 、PPAR- γ (脂肪細胞分化の中心的因子)が LF 処理 72hr で強くダウンレギュレーションされ、さらに大部分の脂肪合成遺伝子の発現は処理後 120hr で抑制されたことを示していた。

PPAR- γ については、近年別の報告でもラクトフェリンにより発現がダウンレギュレーションされることが報告されている(J Oral Sci. 2008 ;50:419-425, Cell Biol Int. 2009 33:283-289)。細胞の種類によって作用は異なるのだろうが、LF が PPAR- γ の発現に直接或いは間接的にかかわっていることは、広範囲の作用を示す LF の謎を解く鍵となるのかもしれない。

6. まとめ・雑感

LF の応用については、例えば米国で非小細胞肺癌に対して、国内では C 型肝炎に対して大規模な臨床試験が行われ、近年特に注目を集めていた。今回の会議では、LF 発見当初からその機能として考えられていた金属の吸収促進作用に着目した基礎や応用研究も、再び報告が増えてきたように思う。鉄の吸収促進や腸内菌叢形成への役割等の乳児栄養学分野で始められた研究が初期の LF 研究の主要テーマであった

が、またその原点に立ち戻り、乳児栄養学分野で蓄積された研究成果を大人の鉄欠乏貧血や成人病の発病予防といった応用にまで広げているところが、このタンパク質の魅力だと思う。

LF会議は、多機能タンパク質のそれぞれの機能に興味を持っている研究者の集まりであるが、その対象のタンパク質が一つであることから、互いの研究内容は基礎から応用まで離れているようでいて、実は密接に関連している。会議の場では、「あの論文の実験条件は間違いだ」とか、「過去の発表と今のスタンスが矛盾している」とか、論文だけ読んでいては紐解くのになかなか苦勞する研究の流れや筋のようなものが、公式・非公式といわず、よく話されていたように思う。研究を発展させるには、このような会に参加して、意中の研究者に直接教えを乞うのが一番近道だと、個人的に感じた。

以上、思いつくままに本学会の発表をまとめた。本報告は学会の発表を網羅的に報告したものでも、主要なトレンドとなる研究を選んだものでもなく、聞き取りやすかった発表や個人的に興味を持った発表を主観でメモし、一部を紹介したものである。間違いや思い違いも、極力排除したつもりだが、まだ残っているかもしれない。学会のプロシーディングが半年後に出る予定なので、正確な内容はそれを見ていただきたい。また、特に興味を持った方は国内でも LF に焦点を絞った複数の会が行われており、それらにぜひ参加をお願いしたい。次回 2011 年の第 10 回国際 LF 会議はメキシコで開催される予定である。