

ラクトフェリンによる肺がんの治療（その1）

…………ラクトフェリンは樹状細胞の活性化因子…………

腸溶性ラクトフェリン研究会

常任理事 安藤邦雄

いろいろなラクトフェリン

多機能蛋白質のラクトフェリンは、ここ数年活発な研究開発の対象になってきた(1)。牛乳から抽出したウシ・ラクトフェリン (b-LF) のほかに①微生物の遺伝子組換え体がつくるヒト遺伝子組換えラクトフェリン (rh-LF)、②母乳から抽出したヒト・ラクトフェリン、③ヒト・ラクトフェリン遺伝子を導入したトランスジェニック・ウシやヤギの乳から抽出されるヒト・ラクトフェリン、④コメ、イチゴなどにヒト・ラクトフェリン遺伝子を導入したトランスジェニック植物等々、百花繚乱である (表1)。今回は二回にわけてヒト・ラクトフェリン遺伝子を導入した糸状菌がつくるヒト型ラクトフェリン (Talactoferrin : TLF) の薬効及び作用機作を紹介する(2)。

表1. ラクトフェリンのいろいろ

	由来	備考
ウシ・ラクトフェリン (b-LF)	新鮮な牛乳あるいはホエイ (乳清)	主たる用途は育児用調製粉乳へ添加。他にヨーグルトへ添加、健康食品素材
遺伝子組換えヒト型ラクトフェリン (Talactoferrin : TLF)	琉球の麹カビ、アスペルギルス・アメリにヒト・ラクトフェリン遺伝子を導入し、組換え体をタンク培養し生産	生産性は培地 1 リットルあたり 5 グラムと高収量。医薬品として米国で開発中。蛋白部分はヒトと同一だが、糖鎖が哺乳類ラクトフェリンと異なりポリマンノース
ヒト型ラクトフェリン	母乳、Transgenic 乳牛、ヤギ、マウスの乳。	オランダとロシアで開発中。注射できる母乳ラクトフェリンは、ロシアでがんと難治性感染症に対する臨床試験が進行中
遺伝子組換えヒト型コメ、イチゴ	日本、米国、スペインで開発に成功。	胃で破壊されるので高付加価値化は不成功。糖鎖は植物型
ホロ・ラクトフェリン	ホロ：1 分子あたり 2 個の三価鉄イオンをキレート (100%鉄飽和)	三価鉄イオンをラクトフェリン水溶液に加え炭酸あるいは蔞酸で中和してつくることできる
アポ・ラクトフェリン	アポ：鉄を含有しないラクトフェリンを指すが、通常は鉄含量が 10% 台から数%に低下したものをアポと呼んでいる。	1995 年に製法が発表になって以来、いくつかの製法が知られている。通常はラクトフェリンの濃縮液を酸性にして三価鉄イオンを遊離させ、限外濾過して鉄イオンを除去している
天然型ウシ・ラクトフェリン	鉄飽和度：10~15%	ラクトフェリンの 70~85%がアポ型と推定される

最近のラクトフェリン研究は従来の日米加及び英独仏の西欧諸国に加え、スウェーデン、イタリア、ロシア、中国、インド等の“ラクトフェリン研究の後進国”が参加し、研究開発が著しく活況を呈するようになっている。

カビがつくる遺伝子組換えヒト型ラクトフェリン (Talactoferrin: TLF)

米国テキサス州ヒューストンに本拠をおくアジェニクスは、1990年代に創立された遺伝



図1. Talactoferrin の製剤

マイナス 10°Cで凍結保存し、患者は空腹時に溶解して摂取する。このような投与方法により胃内で食物と混合し、酸性条件下でペプシンにより分解されるのを避けている。空腹時に溶液として摂取すると、分解が避けられ、50～60%のラクトフェリンが小腸に到達できるといわれている。

子組換えヒト型ラクトフェリン(Talactoferrin : TLF)を医薬品として開発している古いバイオベンチャー企業である。1980年代、ヒューストンにあるベイラー大学の研究者は、未熟児の短腸症候群の原因を追究する過程で、意外なことにラクトフェリンが短腸症候群を治療する可能性があることを発見した。ラクトフェリンを小腸上皮の細胞培養にくわえると、細胞増殖を著しく促進するのである。そこで同大学の研究者達は、遺伝子工学によるヒト・ラクトフェリン (rh-LF) の生産に挑戦した。生産用に選ばれた微生物は、琉球でアワモリ醸造に使われてきた黒麹菌 *Aspergillus niger* var. *awamori* である。日本酒醸造には黄緑色の麹菌 *Aspergillus oryzae* が使われるが、伝統的にアワモリ醸造に使われてきたのは孢子が真黒なこのカビである。当時は遺伝子工学の勃興期にあたり、インターフェロン、成長ホルモン、各種のインターロイキン等がヒト遺伝子組換え大腸菌により生産さ

れるようになった。しかし、この方法には一つの隘路があった。つくられたヒト蛋白質は、菌体を破碎して抽出しなければならなかったのである。抽出液には種々の菌体成分が混入するので、精製が難しく工程が複雑だった。その隘路を打開したのは、アワモリ菌を研究していたわが国の研究者たちで、この菌が菌体内でつくった異種の蛋白質を培地に分泌することを証明したのである。そのため、生産性は著しく高まり、rh-LFの生成量は培地1リットルあたり5グラムに達している(3a)。この量が如何に多いかは、牛乳と対比すれば明らかだ。牛乳のラクトフェリン含量は、1リットルあたり0.15～0.2グラムであり、精製原末の収量はさらに低下する。つまり、遺伝子組換えのアワモリ菌は、125トンの大型タンクで数日間培養するだけで500kgのヒト型ラクトを生産するのである。培地のコストは取るに足らない低額で、牛乳と比べ精製ははるかに簡単である。これはヒト蛋白質の生産における技術革新の一つだった(3b)。

研究の経緯

ベイラー大学の研究者達は、この TLF を始めの目論見どおり育児用調製粉乳に添加し、新生児の生育に及ぼす影響を検討したが、その試みは失敗に終わったらしい。TLF を添加した育児用調製粉乳は、高頻度で新生児に微量金属元素の欠乏症を起こしたのである。本誌で繰り返し述べてきたように、ラクトフェリンは遷移金属イオン、すなわち、鉄、銅、コバルト、ニッケル、クロム、亜鉛等のイオンと強固な錯化合物（キレート）をつくる性質がある。ラクトフェリンは腸管内でこれらの微量金属イオンとキレートし、消化管吸収を妨げるため、新生児に微量金属イオンの欠乏症状が現れたのである。

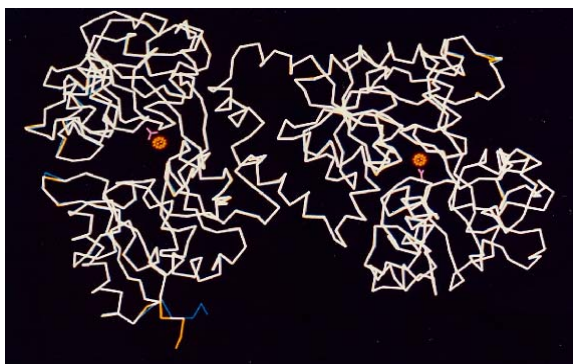
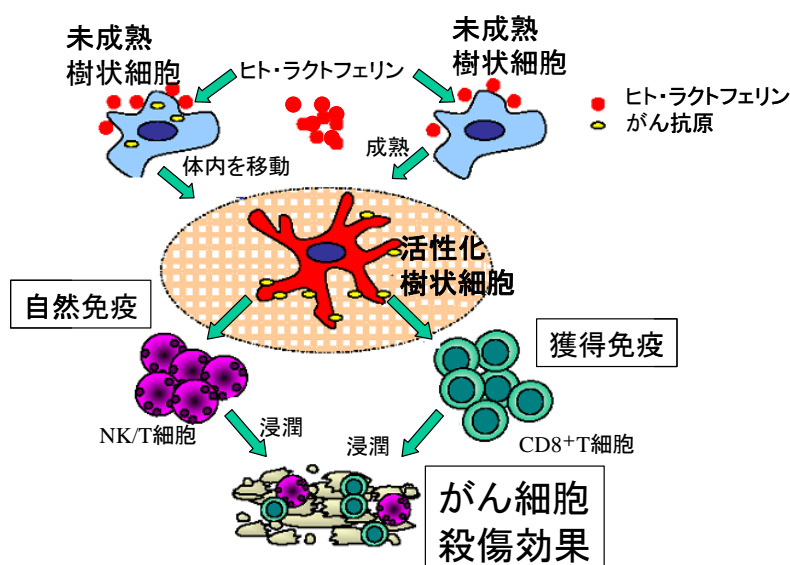


図 2. 遺伝子組換えヒト型ラクトフェリン
アジェニクス提供。2 個の橙色ボールは、C-ローブと N-ローブにキレートされた三価鉄イオンと炭酸イオンを示す。TLF の蛋白部分は、母乳から抽出されたヒト・ラクトフェリンと同一だが、糖鎖はヒト型がシアル酸であるのに対し、ポリマンノースである。TLF は酸性条件下でのペプシンに対する抵抗性が高く、経口投与が可能である。

次に Agennix が狙いを定めたのは喘息の治療であった。気管支拡張作用がある喘息治療薬、 β ブロッカーは心臓停止で死亡する副作用がある。マスト細胞からのケミカル・メディエーター放出を阻害するクロモグリク酸も粉末を吸入する投与形式に問題があったからだった。しかし、喘息治療薬では高額な薬価は期待できないことがジレンマである。同社が最終的に TLF の標的としたのは①非小細胞肺癌(いわゆる肺がん)、②抗原性が高い腎臓がんと③難病中の難病である糖尿病性足壊疽の治療薬である。これらの分野では TLF は画期的な有効性があると評価され、一躍、今後の開発が大きく期待されるようになった。

遺伝子組換えヒトラクトフェリンの作用機作(2)

TLF は経口投与で有効な蛋白質なので作用機作の解明は難航したが、腸管免疫の研究が進展するにつれ少しずつ明らかになっている。本誌 2006 年 4 月号 82-86 ページで触れたように、“ラクトフェリンは粘液に被覆されていないパイエル板及び小腸吸収上皮突端の M 細胞表層に結合し、M 細胞を通り抜けてリンパ管に吸収される”と推定される(4)。ラクトフェリンのような高分子は部厚い粘液に被覆された小腸吸収上皮を通過できないからである。M 細胞を通り抜けた TLF は、パイエル板直下に待機している腫瘍抗原で感作された未成熟樹状細胞表層のラクトフェリン受容体にトラップされ、**internalization** 過程を経て樹状細胞を成熟させる。成熟した樹状細胞は、NK 細胞、NK-T 細胞とキラーT 細胞に腫瘍抗原に関する情報を与え、自然免疫系と獲得免疫系の抗がん作用を活性化する。これらの免疫エフェクター細胞は循環帰巢（ホーミング）を開始し、腸間膜リンパ節を経て胸管に入って体内循環し、がん組織に到達しリンパ節を通過して浸潤しがんを破壊するのである。つまり、TLF は体内で最大の免疫組織である腸管関連リンパ組織（gut-associated lymphoid



tissue, GALT) を介してがん細胞を抑制・破壊することが分かってきた (図 3)。GALT は、パイエル板 (PP)、腸間膜リンパ節、粘膜固有層、腸管上皮間リンパ球 (IEL)、クリプトパッチ (CP) などから構成されている。CP は、粘膜固有層のクリプト部に存在する細胞小集積であり、IEL 前駆細胞が IEL 細胞に発達分化するための一次リンパ組織である。マウスの場合、IEL はほぼすべてが CP 由来の T 細胞であり、胸腺由来の T 細胞とは著しく異なっている。

一方、腸管粘膜を構成する上皮細胞の 3~5 個に 1 個の割合でリンパ球様の細胞が上皮細胞に挟まれた形で分布することが古くから知られ IEL と

図 3. ラクトフェリンの抗がん作用に関する作用仮説

樹状細胞は自然免疫と獲得免疫を問わず免疫賦活に決定的な役割を演ずる免疫担当細胞である。経口摂取されたラクトフェリンはパイエル版 M 細胞から腸管リンパ組織 (gut associated lymphoid tissue: GALT) に取り込まれ、未成熟な樹状細胞の遊走を誘発し、その成熟を促進する。腫瘍患者の場合、未成熟樹状細胞は、腫瘍抗原を取り込んでいる。ラクトフェリンにより活性化された樹状細胞は、自然免疫系の NK/NK-T 細胞並びに獲得免疫系の CD8+ T リンパ球を活性化する。腫瘍の攻撃力が強化されたエフェクター細胞、すなわち、NK 細胞、NK-T 細胞、CD8+ T リンパ球は、腫瘍の原発巣と遠隔の腫瘍転移巣に浸潤し、がんを破壊する。

呼ばれていた。ヒトではテニスコートの 1.5 枚分という広大な粘膜面を構成する上皮細胞の

1/3~1/5 が IEL なのである。近年これらのほとんどが T 細胞であることがわかってきた。特徴的なことはヒトではこれらの上皮細胞間リンパ球 (Intraepithelial lymphocytes; IEL) の約 10~20%が、 $\gamma\delta$ 型の T 細胞セプターを持つ $\gamma\delta$ T 細胞であることである。通常、末梢 T 細胞のレセプターは $\alpha\beta$ 型であり、極めて多様性に富み、認識する MHC に結合した蛋白抗原のレパートリーは膨大であるのに対して、 $\gamma\delta$ T 細胞の認識する抗原のレパートリーは比較的少ない。また IEL は $\alpha\beta$ 型 T 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞の両者を問わず通常の T 細胞とかなり異なったタイプであることがわかっている。これらの変わった T 細胞は通常の T 細胞の胸腺における分化経路と異なる分化過程を経てきたのではないかと考えられる。CP と IEL が TLF による抗腫瘍効果にどのような形で関与しているかについては解明が待たれる。

TLF は、PP の M 細胞を通過し、がん抗原を担って遊走してきた未成熟樹状細胞を成熟させ、成熟した樹状細胞はがん抗原をリンパ球に提示する。感作されたリンパ球は、循環帰巣を開始し、腸間膜リンパ節を経て胸管に入って体内循環し、がん組織に到達してがんを破壊するのである。

TLFによる非小細胞肺がんの治療(2)

一般に肺がんと呼ばれる非小細胞肺がん (NSCLC) は、わが国では男女ともがん死亡のトップ、米国におけるがん死亡の 30% 近くを占める。米国国立癌研究所 (NCI) によると 2005 年、米国では 17 万 3 千人が肺がんと診断されている。さらに、WHO によると世界中で毎年 120 万人が肺がんと診断され、110 万人が死亡する。肺がんの約 80% が非小細胞癌

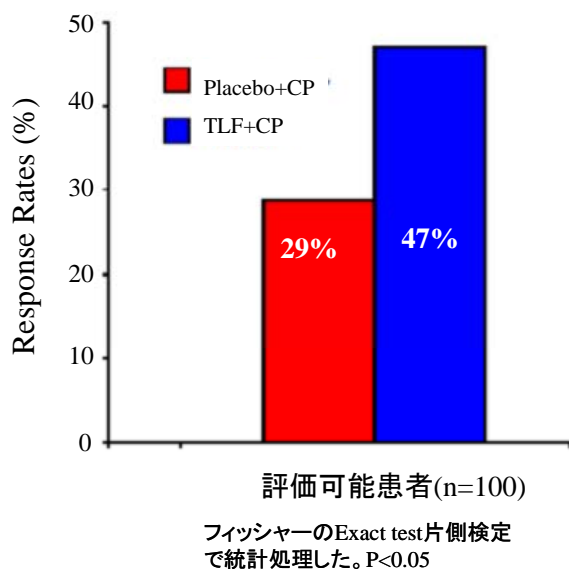


図 4. 二重盲検試験における TLF による肺がん治療成績

CP: 非小細胞肺がん治療の第一選択抗癌剤である白金錯体、カルボプラチン+パクリタキセルの併用療法 (赤のバー) と CP+TLF (青バー、1.5 グラムを一日に 2 回経口摂取)、バーの中の数字は有効率

110 名の患者すべてが治療中に少なくとも 1 回の CT scan を受けて安全性面で評価可能であった。TLF は抗がん作用を示す新規の免疫賦活剤であり、非小細胞癌患者における臨床第 1 相及び第 2 相試験は実施済みである。図 4 に示すように二重盲検試験における対照群の有効率が 29% であるのに対し、TLF を与えた群のそれは 47% でフィッシャーの exact test で統計処理すると $P < 0.05$ で有意であった。動物実験で TLF は NK-T 細胞とキラー T 細胞 (CD-8+) を賦活し、標準的ながん化学療法剤の効力を増強することが分かっている。すでに、TLF は 400 名以上の人々に投与され、安全で長期投与できる。試験終了後、FDA 担当官を含めた総括者によると、TLF の有効性と安全性から見た有用性は明らかであり、第三相試験に進むに値するとのことで、2008 年 1 月から第三相試験が行われている。

である。治療法は、外科手術、化学療法、放射線療法及び分子標的の抗癌剤だが、非小細胞癌は治療が難しく、それによる死亡者は米国だけで年間 16 万人に達する。

Agennix 社は進行性あるいは転移性の非小細胞肺がん患者 110 名 (ステージ III/IV) を第一選択薬であるカルボプラチン/パクリタキセル (C/P) の標準化学療法で治療した。その際、患者を無作為に 2 群に分けて一群にヒト遺伝子組換えラクトフェリン (talactoferrin, 1.5 g を毎日 2 回) を経口投与し、他の群に偽薬を投与した。C/P の投与は 1 サイクルが 3 週間、talactoferrin 投与は 35 日サイクルで抗癌剤投与の 1, 3, 5 サイクル目に投薬開始の直後から与えた。治療の Endpoint は「固形がん評価基準」に基づき CT Scan で評価した最高の改善効果を示した点とした。

ラクトフェリンによるがん治療の今後

1990年代から2003年にかけて国立がんセンター研究所癌化学療法部のリーダーだった津田洋幸博士（現名古屋市立大学医学部）は実験動物の化学発がんに対する牛乳ラクトフェリン（b-LF）の化学予防効果を研究した（5）。がんがわが国における死亡原因のトップになりがん研究者は脚光を浴びるようになったとは言え、がんの化学予防は発癌実験を完了するまでに気が遠くなるほどの忍耐が必要な陽が当たらない研究分野である。それにもかかわらず10年以上にわたる津田博士等の努力は称えられてしかるべきであろう。彼らは2003年に発行された「医学のあゆみ」で次のように述べている（6）。

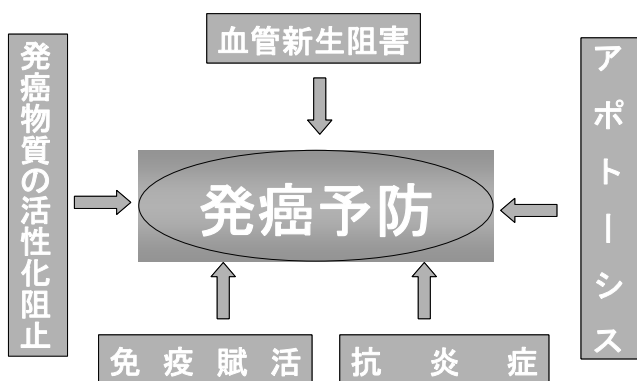


図5. ラクトフェリンによる発癌阻止の作用機序

“わが国での死因の第一位は癌であり、癌の発生、転移、再発に対する癌予防法の確立は重要な課題である。癌予防に関して、ある物質を食物に加えて積極的に予防を成功させようという試みが化学予防(chemoprevention)といわれる領域であるが、これまでの動物実験から、多価不飽和脂肪酸、カロテノイド、およびポリフェノールなどに発癌予防効果のあることが示されてきた。しかし、

それらは有効用量で毒作用を発現したり、標的以外の臓器に発癌プロモーション作用などの副作用が観察され、実際面での応用まで進められているものは少ないのが現状である。著者等は哺乳動物の初乳中に高濃度に存在するb-LFが経口投与で種々の臓器において発癌を抑制することを見出した。b-LFは発癌を抑制する有効量での毒性発現と標的以外の臓器における発癌プロモーション等の副作用はいっさいなかった。”この事実は従来から知られていた癌化学予防物質と比べ格段の差である。b-LFはポストイニシエーション、または発癌剤と同時投与すると、大腸において顕著に発癌を抑制し、さらに肝、膀胱、食道、舌でも発癌をある程度抑制する。これまでb-LFほど広範囲に有効な発癌抑制物質は知られていなかったのである。津田等が提唱するb-LFの発癌予防メカニズムを図5に示した。

一方、本誌の先月号で紹介した慈恵医大の坪田昭人准教授等は遺伝性の銅代謝不全により惹起されるウイルソン病の病態モデルLECラットにb-LFを摂取させると、劇症肝炎への進展が抑制されることを明らかにした。LECラットは劇症肝炎から回復しても、1年以内に100%が肝臓癌で死亡する。つまり、ミトコンドリアへの銅イオン蓄積がもたらす多量のヒドロキシルラジカル発生が、①蛋白質、脂質及び核酸を酸化させ遺伝子の変異を誘発すること、②遺伝子発現をコントロールするプロモーター部位のCpG islandにおいて、シトシンがメチル化されるepi-genetic変異が、遺伝子修復酵素の発現を抑制し発癌に直結するのである。b-LFが①と②を抑制するという坪田等の発見は、津田らによるb-LFの化学

発癌予防についての作用機作を決定的に証明した画期的な業績だった(7)。遺伝子の化学的変化と **epi-genetic** な変異が発癌の原因であることが確定しているからである。

これらの基礎的な業績を背景とすれば、がんに対する **TLF** の有用性は至極当然として受け取ることができる。**TLF** は糖鎖がカビ由来のポリマンノースだったことが胃内でのペプシン抵抗性をもたらし、経口投与を可能にしたのは幸運だった。既に 2008 年 1 月 18 日に **FDA** から **TLF** の非小細胞肺癌に対する第三相臨床試験の認可がおりた。第二相臨床試験の再現性があれば、**FDA** が 2 年以内に **TLF** を肺癌治療薬として認可することはほぼ確実である。また、腎臓がん及び糖尿病性の足壊疽に対する臨床試験も好成績のうちに進行中なので大幅な用途拡大が見込まれている。

B 細胞悪性リンパ腫治療薬としてグローバルな年商が 3000 億円以上に達する大ヒットとなった抗体医薬リツキシマブ(商品名 ; リツキサシ)と比べ **TLF** の医薬品業界に与えるインパクトははるかに大きくエリスロポエチンを凌駕する超大型バイオ医薬品に成長するのではなかろうか。最近の分子標的治療薬と称されるチロシンキナーゼ阻害剤、抗体医薬を含め抗癌剤は患者の **QOL** を大きく損なうクスリばかりである。逆に、副作用のデパートのようなクスリでないと抗癌剤ではないとする風潮すら存在する。そのようななかにあつて **TLF** は患者の **QOL** が向上する最初の抗癌剤として高く評価されるだろう。**TLF** の適応症、安全性、競合薬剤、医療経済からの視点等についての解説は次号に譲ることとする。

引用文献

- (1)第 8 回国際ラクトフェリン会議、2007 年 10 月 21-24 日開催の要旨集を参照のこと。
- (2) Agennix ホームページ e: <http://www.agennix.com/>
- (3a) Ward P., et al.; *Biotechnology* 13: 498-503, 1995
- (3b) Headon D.R.; *Excerpta Medica Int. Congr. Series* 1195, Shimazaki et. al. edited, 2000, pp415-427
- (4) 本誌、2006 年 3 月号、82-86 ページ
- (5) Tsuda H., et al. *Drug Metab. Pharmacokin.* 19: 245-263, 2004
- (6) 藤田健一、津田洋幸、*医学のあゆみ*、204 : 101-104、2003
- (7) Tsubota A, et al. *J Hepatol.* 2007 Dec 27