

ホロラクトフェリンは抗癌剤のアジュバント

腸溶性ラクトフェリン研究会

常任理事 安藤邦雄

ラクトフェリンは二つの 3 価鉄イオンをキレートする分子量 78kDa の一本鎖糖タンパク質であり、外界と直接接触する粘膜を覆う粘液に含まれ、生体防御の一翼を担っていると考えられる。がんの一次予防と二次予防に関しては、国立がんセンターの津田等⁽¹⁾はウシラクトフェリン (BLF) を化学発癌剤に暴露されたラットに摂取させると、大腸、肺、食道、膀胱および舌における発ガンを抑制し、がんの転移を減少させることを報告している。

本誌でたびたび紹介したように、BLF はワクチンの効果を強めるアジュバントだが、BLF ががん化学療法剤の効力を増強するかどうかは組織的に研究されていなかった。Kanwar 等はマウスにがんを移植する前から少量の鉄飽和型 BLF (ホロ BLF) を飼料に混合して摂取させ、移植したがんの直径が 0.6cm に達した時点で 1 回だけがん化学療法剤を投与すると、がんを完全に退縮 (regression) させることを見出した。彼らを使用した移植がんは、C57BL/6 系マウスに原発し遠隔転移を好発する同系悪性腫瘍で、がん化学療法剤はタキソール、アンスラサイクリン系抗生物質、5-フルオロウラシル (5-FU) 等である。化学療法剤は 1 回投与するだけだが、EL-4 悪性リンパ腫とルイス肺がんを完全に退縮させる。つまり、化学療法剤による刺激は原発巣と同時に全身に転移したがんを一掃したことを意味する。興味深いことに、鉄飽和度が低い BLF、すなわち、アポ BLF (鉄飽和度 4%)、天然型 BLF (鉄飽和度 ; 15%) と 50%鉄飽和 BLF を与えた群は、ホロ BLF ほど顕著な効果は認められなかった。ホロ BLF は腫瘍局所における血管新生と血流を減少させ、脾臓細胞の腫瘍に対する細胞傷害活性、腫瘍細胞のアポトーシスと腫瘍への細胞浸潤を増大させる。また、ホロ BLF 摂取は腸管と腫瘍内における Th1 と Th2 サイトカインと一酸化窒素 (NO) 産生を増加させた。化学療法剤は造血機能を傷害し、末梢血中の赤血球と白血球数を減少させるが、ホロ BLF を摂取させると血球数はまったく減少しない。そこで、Kanwar 等は BLF を真に有効にするには鉄イオンを飽和させねばならないと主張している。

1. ホロ BLF はがん化学療法剤の効力を増強し、腫瘍を退縮させる。

一群 10 頭のマウスにアポ BLF (鉄飽和度 4%)、天然型 BLF (鉄飽和度約 15%)、50%鉄飽和 BLF と 100%鉄飽和 BLF を 1.29%(W/W)添加した ANI93G 基礎飼料を与えて飼育した。目的は BLF が“がん化学療法剤の効力を高めるかどうか”、および“鉄が何らかの役割を果たすかどうか”を検討するためである。対照のマウスは ANI93G 基礎飼料のみを与えた。飼料の摂取開始 2 週間後、EL-4 悪性リンパ腫細胞 2×10^5 個を皮下に移植し、さらに数週間後、腫瘍直径が 0.6cm に達した時点でマウスにタキソール 30mg/kg を 1 回だけ皮下投与した。BLF 混合飼料を摂取させると、対照群と比べた腫瘍の成長は 0 日～49 日目にかけて 13～31%抑制された。それに加え、ホロ BLF 群の 1 頭は腫瘍生着を拒絶し腫瘍フリ

一であった(図 1)。

タキソールの抗がん効果は、鉄飽和度を異にする BLF のあいだで大きく異なる。対照飼料群ではタキソールの抗がん効果が見られない一方、ホロ BLF を摂取したマウスは、タキソール投与 2 週間後でがんの直径が半分以下に縮小し、3 週間後にはがんが退縮 (regression) した。鉄飽和度が低い BLF を摂取したマウスは、がんを退縮させなかった。ホロ BLF 混合飼料を摂取したマウスから得た脾臓細胞の ex vivo におけるがん細胞傷害効果は、がんを退縮させる効果と並行し、ホロ BLF 摂取マウスは、対照マウスのそれと比べて有意に 6 倍も高く、50%ホロ BLF 群と比べ 1.5 倍、天然型と比べ 3.4 倍、アポ BLF と比べ 2.4 倍 (それぞれ $P < 0.001$) 高値であった。

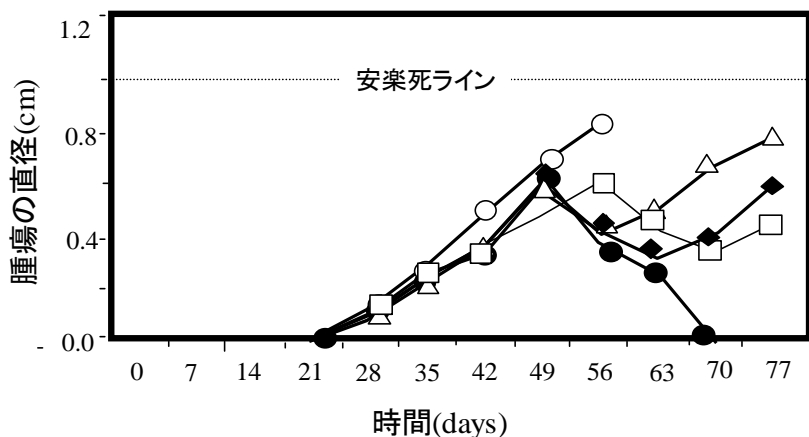


図 1. ホロ BLF の経口投与によるタキソールの抗腫瘍効果増強

C57BL/6 マウス (n=10)、8-10 週齢♂を使用。飼料は ANI93G。アポ BLF (鉄飽和度 4%)、天然型 BLF (鉄飽和度約 15%)、50%鉄飽和 BLF、100%鉄飽和 BLF を 1.29%(W/W)ANI93G に添加した飼料を与えて飼育した。○; BLF 無添加対照群、●; ホロ BLF 群、△; アポ BLF 群、◆; 50%鉄飽和 BLF 群、□; 天然型 BLF 群。タキソールの投与; 無添加対照群、ホロ BLF 群、50%鉄飽和群は 49 日目、天然型 BLF 群は 56 日目に投与。主要の直径が 1cm を越えた時点でマウスは安楽死させた。ホロ BLF だけが腫瘍を完全に退縮させる。

2. ホロ BLF は高い化学療法係数でがんを退縮させる

いろいろな濃度にホロ BLF を添加した飼料を調製し、腫瘍移植マウスにおけるがん化学療法剤の効力増強をしらべた(図 2)。ホロ BLF; 0.04%群と同 4.2%群では、がん化学療法剤を投与する移植 4-5 週の時点で、がんの成長速度は対照群とほぼ同等だったが、0.21~1.0%を飼料に添加した群は、対照群と比べ同時期における腫瘍の増殖は明らかに鈍化した ($P < 0.05$)。移植を拒絶した腫瘍フリーのマウスは、ホロ BLF の 0.04%群で 1/10、0.21%群で 2/10、1%群で 3/10 であった。マウスの腫瘍が直径 0.6cm に達した 49-56 日目にタキソールを投与したところ、これら 3 群ではすべてのがんが退縮した。しかし、ホロ BLF 4.2%群はタキソールを投与すると、がんは 2 週にかけて退縮するが、2 週目から増殖が再開された。56 日目の対照群マウスから得た脾臓細胞とホロ BLF 群の 77 日目に得た脾臓細胞のがん細胞傷害効果は、がんの退縮に比例していた(図 3)。脾臓細胞のがん細胞傷害作用は、0.21-1.0%のホロ BLF 群が最高で、タキソールとの併用で急速かつ完全ながん退縮を引き起こす効果と、移植がんの生着を阻止する活性とは相関している。対照的ながん細胞傷害活性が最低のホロ BLF 4.2%群は、タキソールと相乗的な抗癌作用を示さなかった。

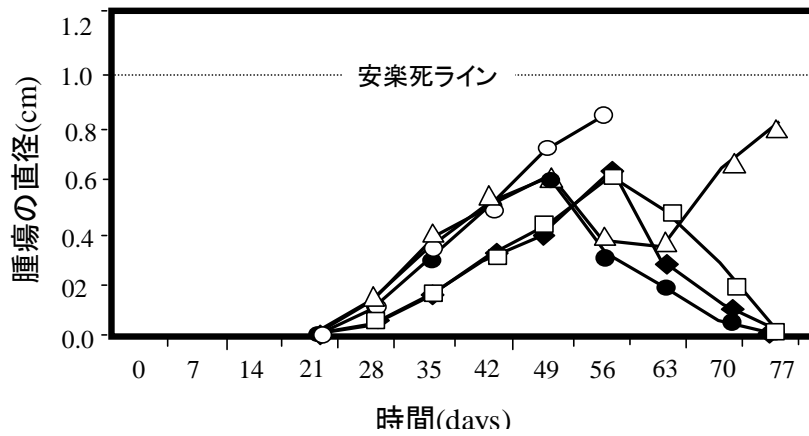


図2. ホロ BLF の用量依存性

C57BL/6 マウス(n=10)、8-10 週齢を使用。飼料は ANI93G。EL-4 悪性リンパ腫は 5×10^5 を 14 日目に移植。ホロ BLF は飼料に各 0.04%、0.21%、1.0% 及び 4.2% 添加して飼育した。対照群は ANI93G 飼料のみで飼育した。○; BLF 無添加対照群、△; ホロ BLF4.2% 群、□; 同 1.0% 群、◆; 同 0.21% 群、●; 同 0.04% 群。タキソールは、ホロ BLF0.21% 群とホロ BLF1.0% 群(56 日目に投与)を例外として、がん移植の 49 日目に投与。がんが生着しなかった個体数; 0.21% 群 3/10、1.0% 群 2/10、0.04% 群 1/10

この実験で明らかになったことの一つは、ホロ BLF には明らかな容量依存性があることであり、最小の 0.04% と最大の 1% とのあいだには 25 倍の開きがあることは注目に値する。通常のがん化学療法剤は、有効量と最大耐過量との比が通常 1、この比が 5 もあれば安全な化学療法剤と評されるからである。

ホロ BLF4.2% 群の脾臓細胞は、1.0%、0.21%、0.04% 群と比べ、32%、34% および 42% の細胞傷害効果しか示さない。この事実は腫瘍の退縮を引き起こすには、ある閾値レベル以上のがん細胞傷害効果が必要なことを示唆する。ホロ BLF を 0.04、1.0 および 0.21% 含有飼料を摂取し、がん移植を完全に拒絶した 6 頭におけるがん細胞傷害作用は、対照と比べ 2.6 倍 ~ 4 倍高いのである。

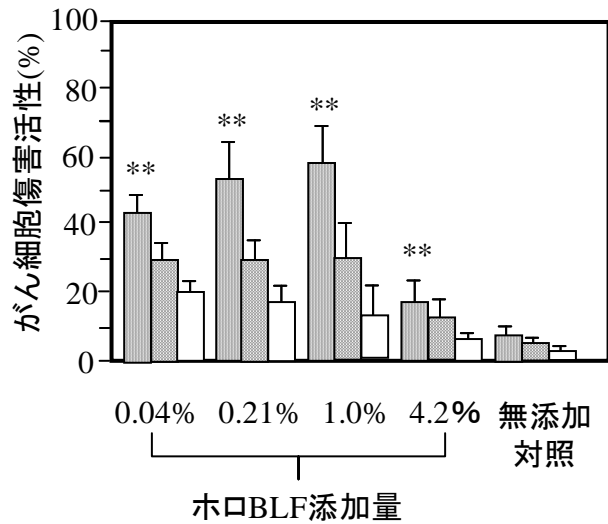


図3. ホロ BLF 摂取マウス脾臓細胞のがん細胞傷害活性(ex vivo)

図2 に示す実験のマウスから脾臓細胞を採取してエフェクター細胞とし、培養 EL-4 悪性リンパ腫細胞を標的としてがん細胞と混合し、がん細胞障害効果を測定した。エフェクター細胞: がん細胞の混合比「点線のバー(100:1)、縞バー(50:1)、白バー(24:1)。各バーは平均値+SE を示す。 **P<0.001、Student's t-test.

3. ホロ BLF は数種のがん化学療法剤と相乗的な抗癌作用を示す

前述のようにホロ BLF は悪性リンパ腫に対しタキソールと相乗的な併用効果を示すが、この効果がタキソールと EL-4 悪性リンパ腫の組合せに限定されるのか、それとも他のがん化学療法剤、例えば、“ドキソルビシン、エピルビシン、5-FU、サイクロフォスファミド、メトトレキセート等の主要ながん化学療法剤と相乗的な抗癌作用を示すのか”を解明することは重要である。

表 1. ホロ BLF のがん化学療法剤との相乗効果

ガン化学療法剤		がん腫	相乗効果
濃度 依存	タキソール	EL-4、	Regression して治癒
	ドキソルビシン	EL-4	同上
	エピルビシン	EL-4、ルイス肺がん	同上
	5-フルオウラシル	EL-4、B16 黒色腫	EL-4 は regression 治癒、B16 は化学療法剤投与 3 週目から増殖再開
時間 依存	サイクロフォスファミド ⁵	EL-4	化学療法剤投与 3 週目から増殖再開
	メトトレキセート	EL-4	無効

C57BL/6 マウスを標準飼料 AIN93G で飼育。ホロ BLF 添加量：1.2%。がん化学療法剤は 2×10^5 の腫瘍細胞を移植して 2 週後に皮下注射。タキソールの投与量は 30mg/kg、ドキソルビシンは 15mg/kg、これらのがんの直径が 0.6cm に到達した段階で 1 回だけ投与した。

表 1 にホロ BLF、がん化学療法剤、がん腫の組合せで行われた実験の結果を要約した。いずれの組合せでも対照群に移植したがんは急速に成長し、がん化学療法剤は単独でも併用でもがんを退縮させる効果はなかった。ただし、ドキソルビシンは EL-4 の増殖を 3 週間遅らせ、両者の併用は 5 週間遅らせた。対照的にホロ BLF 群に移植した腫瘍は、がん化学療法剤を投与する前から対照群と比べてがん増殖が遅延し、さらに、がん化学療法剤を投与すると、がんは 1 週間以内に半分以上に縮小し、2 週間後には完全に消失した。劇的な効果を示すのは濃度依存性薬剤に多く、サイクロフォスファミド、メトトレキセート等の時間依存性薬剤は無効である。

担がんマウスから腫瘍組織を採取し、腫瘍細胞のアポトーシス、白血球浸潤および血管新生をしらべた。対照マウスの腫瘍は殆どアポトーシス細胞を含まなかったが、ホロ BLF 対照群マウスの腫瘍切片はおびただしい数のアポトーシス細胞で満たされており（アポトーシス指数；1.9 倍、 $P < 0.001$ ）、さらに、ホロ BLF とタキソール、ドキソルビシンあるいは両剤併用群におけるアポトーシス細胞は、ホロ BLF 対照と比べ、それぞれ 4.2 倍、5.4 倍および 4.9 倍であった。ホロ BLF マウスから得た脾臓細胞のがん細胞傷害活性は、対照群のそれと比べて 3.6 倍 ($P < 0.001$) 亢進していた。それとは対照的にタキソールとドキソルビシンは脾臓細胞のがん細胞傷害活性を 2.3 倍 ($P < 0.05$) あるいは 2.0 倍 ($P < 0.05$) しか亢進させなかった。ホロ BLF とタキソール、ホロ BLF とドキソルビシンあるいは両者の併用は、脾臓細胞におけるがん細胞傷害活性を 4.9 倍、5.5 倍および 7 倍亢進させた。

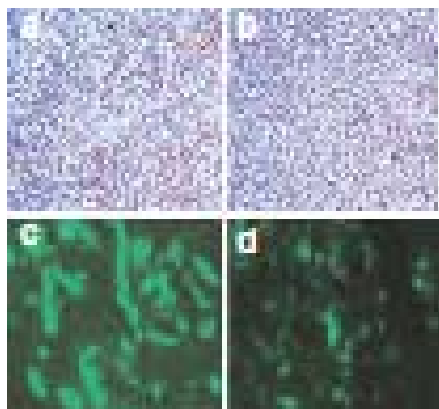


図 4. 代表的ながん組織切片血管の状態

a と b は対照群マウスの EL-4 悪性リンパ腫組織切片における血管の状態。c と d はホロ BLF を与えタキソールを 1 回投与したがん切片の血管。a と b は抗-CD31 モノクローナル抗体で染色、c と d は血流を記録するため DiOC7 で環流した。

ホロ BLF は対照群と比べ、がん組織中の CD4+、DC8+、NK 細胞、IFN- γ 発現細胞、樹状細胞を、それぞれ 2 倍、2 倍、1.3 倍、2 倍、2.5 倍増加させた。対照群にタキソールを投与すると、CD4+ と CD8+ リンパ球のがん組織への浸潤を 1.8 倍と 1.2 倍増加させたが(各 $P < 0.001$)、NK 細胞、IFN- γ 発現細胞および樹状細胞は増加しなかった。ホロ BLF とタキソールあるいはドキソルビシンを併用すると、対照群と比べ、CD4+、CD8+、NK、IFN- γ 発現細胞、樹状細胞のがん組織への浸潤は、それぞれ 5 倍、3.5 倍、4 倍、4 倍、3 倍、5.3 倍および 3 倍増加した。ドキソルビシンのみでも各免疫細胞のがん組織浸潤は、5 倍、5 倍、2 倍、3 倍、および 2 倍増加したが、ホロ BLF、タキソールとドキソルビシンの三者併用は、ほとんど影響がなかった。図 4 に示すように、ホロ BLF を併用すると腫瘍組織の血管新生が強く阻害され、その結果、局所への血流がほとんど途絶している。つまり、腫瘍組織は糧道を絶たれ、同時に免疫細胞に攻撃されてアポトーシスを起こさざるを得ない状態に陥っていることがわかる。

4. 化学療法剤の効力を発揮させるには、投与の少なくとも 2 週間前からホロ BLF を与える必要がある

化学療法剤を与える前にホロ BLF をどのくらいの期間与える必要があるかを定める実験を行った。上記の条件とは異なり、この実験では EL-4 移植と同時にホロ BLF を摂取させた。

表 2. 化学療法剤投与のタイミング

ホロ BLF 添加量	ホロ BLF の摂取時期	効果		備考
		退縮	無効	
1.2%	EL-4 移植と同時	3	2	
〃	〃	3	2	24 日目に対照飼料に変更
〃	EL-4 移植 12 日目から摂取開始	0	5	一時的に縮小する個体がある。ホロ BLF の効果は±
〃	EL-4 移植度同時に摂取開始	0	5	
〃	ドキソルビシン投与 3 日後から摂取開始	0	5	化学療法剤はがん成長をまったく阻止しない
0	ホロ BLF を摂取しない対照群	0	5	

(n=5) ドキソルビシン：EL-4 移植の 15 日目に 15mg/kg を 1 回だけ腹腔内投与。

ホロ BLF の摂取量：飼料の 1.2% 相当量を添加

先に述べた腫瘍移植に先立つ 2 週間前からホロ BLF を摂取する条件ではないので、すべての担がんマウスに腫瘍退縮を起こさないが、明らかな傾向を見て取ることができる。すなわ

ち、化学療法剤投与による刺激でがんを退縮させるには、少なくとも投与の 2 週間前からホロ BLF を摂取させる必要があり、24 日目から対照飼料に切り替えても効果に影響はない。

5. ホロ BLF は化学療法剤に続発する造血障害を阻止する

細胞毒系の抗がん剤は、骨髄の造血機能を傷害し、白血球減少症と貧血を起こす。

表 3. 血球のカウントとがん組織の血管計測

実験群		血球数 ^a		表面積あたりの血管カウント ^b		
		白血球	赤血球	CD31	CD105	DiOC7
基礎飼料対照健全常群		2.7±1.0	5.5±1.1	NA	NA	NA
担がんマウス	基礎飼料対照	2.5±0.5	4.5±1.5	32.3±9.9	16.5±6.6	38.5±8.8
	ホロ BLF	3.5±1.2	8.2±2.5	20.4±7.7*	9.0±5.2*	18.4±8.6*
	タキソール	ND	ND	10.5±6.7**	4.5±3.2**	11.3±5.3**
	ドキシソルビシン	ND	ND	11.5±5.3**	6.5±4.5**	13.4±6.7**
	タキソール+ドキシソルビシン	0.3±0.1	2.1±1.5	ND	ND	ND
	ホロ BLF+タキソール	3.7±1.5	8.3±2.5	7.5±3.**2	4.4±2.2**	10.4±3.6**
	ホロ BLF+ドキシソルビシン	3.8±1.5	8.5±2.5	8.5±4.2**	5.6±3.1**	10.7±3.9**
ホロ BLF+両者併用	3.9±2.0	8.7±3.5	5.2±2.2**	2.4±1.0**	5.8±2.5**	

n=10、略号：NA; no application, ND; not done. 数値は mean±SE

P：基礎対照飼料摂取群に対する有意差。*P<0.05, **P<0.001

^a 平均血球数：剖検時に心臓から採血しカウント、赤血球=2 x 10⁶/μl、白血球=2 x 10³/μl

^b 腫瘍血管の密度

表 3 に示すように、タキソールとドキシソルビシンを併用し 1 回だけ投与しただけで、7 日後でも白血球と赤血球を明らかに減少させる。つまり、両薬剤は骨髄抑制と貧血を起こすのである。ホロ BLF 摂取は、両化学療法剤を投与されたマウス末梢血の赤血球と白血球数を正常以上のレベルに回復させた。赤血球と白血球数を健全マウスと比較すると、担がんマウスのほうが 50%以上多い。また、脾臓重量も担がんマウスと比べると 20%前後増加し、対照群と比べた脾臓の CD4+、CD8+、NK、IFN-γ発現の樹状細胞等を増加させた(P<0.001)。小腸の粘膜固有層でも樹状細胞を例外として同様の傾向があった。

6. 小腸上皮と結合したホロ BLF は、パイエル板に取り込まれ、Th1 および Th2 サイトカインの産生を増大させる

ホロ BLF は小腸上皮に結合し、パイエル板から体内に取り込まれ Th1 と Th2 サイトカイン及び NO 産生を増加させる。ビオチン化したホロ BLF を小腸ループに加えた実験結果を図 5 に示す。ホロ BLF は小腸絨毛と小腸粘膜固有層に分布し、さらに、パイエル板とも結合し、リンパ管に遊走しているリンパ球と結合して、細胞に取り込まれインターナリゼーションが起こすらしい。

同様な分布パターンはホロ BLF のモノクローナル抗体で染色した切片でも得られた。この結果はホロ BLF がパイエル板から取り込まれ、小腸の遺伝子発現を含む粘膜免疫を調節することを示唆する。

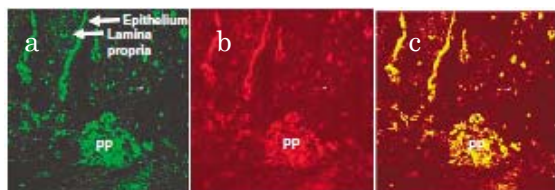


図 6. ビオチン化ホロ BLF の小腸パイエル板への結合

PBS にビオチン化 BLF を溶かし、小腸ループに 4 時間インキュベートした。(a) 小腸ループの切片をビオチン化 BLF 検出のため染色した。一つは蛍光性のイソチオシアン酸を結合させたストレプトアヴィジン染色、今一つはテトラメチルローダミンとカップルした抗 BLF ウサギ抗体で染色。絨毛上皮と粘膜固有層は矢印で示す。倍率;40 倍。PP:パイエル板、(b) ストレプトアヴィジン-ペーパーオキシダーゼ法でビオチニル BLF を検出。倍率;40 倍

において上記サイトカインレベルを増加させた。NO は腫瘍組織で 1.6 倍 ($P < 0.001$)、小腸で 3 倍から 8 倍増加した。

7. むすび

鉄の過剰摂取は発がん⁽³⁾するので避けるべきであるが、本研究においてホロ BLF を飼料に 1.2%混合して摂取した際の鉄含量は、無視しうる程度の 0.0053%から 0.0069%に増加するだけである。そのためか、ホロ BLF を摂取したマウスは何らの中毒症状も示さなかった。さらに、最小有効量のホロ BLF 0.04%の場合、飼料の鉄含量は 0.00005%増加するに過ぎない。

ホロ BLF は腫瘍のアポトーシス増大に直結する宿主の防衛反応を促進する。その抗がん効果 (in vivo) とエフェクター細胞による腫瘍傷害活性(ex vivo)は相関するので、ホロ BLF が腫瘍免疫を賦活することを示唆している。事実、シャピロ等⁽⁴⁾は遺伝子組換えヒトラクトフェリン(TLF)の抗腫瘍活性が CD8(+) T リンパ球と CD1 をノックアウトしたマウスで失われることから、TLF の抗腫瘍活性は、キラーT 細胞とナチュラルキラー細胞に由来することを示した。

ホロ BLF が、がん化学療法剤の抗腫瘍活性を増強するメカニズムについてはまだ解明されていない。可能性の一つにホロ BLF は消化管を通過する際、アポ BLF と比べ消化酵素に対する抵抗性が強く分解され難いので、バイオアベイラビリティが高まることが考えられる。例えば、Brock 等はホロ BLF と鉄 20%飽和 BLF と比べ、前者はトリプシン消化に対しはるかに強い抵抗性を示すことを報告している⁽⁵⁾。

これとは別の可能性はホロ BLF がパイエル板からリンパ管に取り込まれる際、パイエル板に待機する樹状細胞とリンパ球のラクトフェリン受容体に結合し、3 価鉄イオンを免疫細胞に送り込むことにより免疫を賦活するシナリオである。免疫担当細胞への 3 価鉄イオン取り込みが、免疫能を賦活することを証明した論文がある。例えば、ヘミンはまったく抗腫瘍活性を示さないが、IL-2 と併用すると腫瘍の成長を抑制する⁽⁶⁾。有機鉄化合物のフェロセンは、in vitro と in vivo でリンパ球とマクロファージを活性化し、経口投与すると担がんマウスに顕著な抗腫瘍活性を示す⁽⁷⁾。この報告と一致してシーボルト等は鉄欠乏の幼児において細胞性免疫に質的な欠陥が起こることを報告している⁽⁸⁾。

既にわが国の国立がんセンター⁽¹⁾および本誌に 2 回紹介したアジェニクス社の遺伝子組換えヒト・ラクトフェリン (TLF) の研究成績⁽⁹⁾から見て、ラクトフェリンががんの一時予防および二次予防に有用であることはほぼ確かである。問題は実験動物で得られた成果をどのようにしてヒトの臨床で再現することだろう。それには、Kanwar 等⁽²⁾とアジェニクス社⁽¹⁰⁾が主張するように、経口投与した「intact ラクトフェリン」を如何に多くパイエル板が存在する回腸に到達させるかにかかっている。

文献

- (1) Tsuda H et al.; Drug Metab Pharmacokinet. 2004; 19: 245-63.
- (2) Kanwar JR et al.; Immunol Cell Biol. 2008 Mar-Apr; 86: 277-88.
- (3) Okada S et al.; Jpn Arch Intern Med. 1982; 29: 485-491.
- (4) Spadaro M et al.; Cancer Res 2007; 67: 6425-6432.
- (5) Brock JH et al.; Biochim Biophys Acta 1976; 446: 214-225.
- (6) Kovjazin R et al.; FASEB J. 2003; 17: 467-469.
- (7) Tsuji A et al.; Clin Exp Immunol 1993; 93: 308-312.
- (8) Thibault H et al.; Eur J Pediatr 1993; 152: 120-124.
- (9) Varadhachary A et al.; Int J Cancer 2004; 111: 303- 398.
- (10) <http://www.agennix.com/contentpages/presentations.htm>