

第 53 回 “酸素ラジカルと動脈硬化（その 2）”

腸溶性ラクトフェリン研究会

常任理事 安藤邦雄

1. 前回のあらまし

動脈硬化はがんと並んで人類の二大死亡原因をなす典型的な生活習慣病である。身体の中の動脈にも硬化性病変は起こりうるが、特に危険なのは脳血管と心臓の冠動脈に起こる動脈硬化……それぞれ脳血管障害と虚血性心疾患を発症する……である。ここ四半世紀、メタボリック症候群を始めとして色々な角度から動脈硬化の研究が進展し、生活習慣の改善および薬物の進歩によって循環器病の治療と予防が大きく前進した。

当研究会は“ラクトフェリンのように 2 価の銅イオンと強固な錯化合物をつくり¹⁾、投与するとミトコンドリアに分布する化合物は、動脈硬化を防御/改善する性質がある”と考えている。このような考えに到達したのは、下記の根拠からである。

- (1) 動脈にアテローム・プラック(アテローム)を発生させる酸化 LDL は、LDL を微量の 2 価銅イオンとインキュベートすると生成する。
- (2) LDL を酸化するのは、活性酸素から銅イオンの触媒により生ずる酸化ラジカルである。
- (3) 銅イオンのキレーターを添加すると *in vitro* における酸化 LDL の生成反応は停止する。
- (4) プロブコールのように *in vitro* で、マクロファージが泡沫細胞化するのを阻止する化合物は、*in vivo* でも家兎の実験的な動脈硬化を抑制する。
- (5) *in vitro* で 2 価銅イオンと強固なキレートをつくるアスコクロリン系化合物は、*in vivo* で家兎とウズラの実験的動脈硬化を強く抑制した、
- (6) ウイルソン病のモデルである LEC ラットは、銅の胆汁排泄経路が遺伝的に欠損しているため、銅イオンが肝臓と神経に蓄積し、その触媒作用により酸素ラジカルが多量に生成する。ラクトフェリンを飼料に混合して LEC ラットに摂取させると、遺伝子の変異およびエピジェネティックな変異を含め酸素ラジカルによる有害な作用が抑制される。

最近発見されたデルタラクトフェリンは、活性酸素の発生源であるミトコンドリアに局在することが報告されているので、ラクトフェリンを経口的に摂取すると、酸素ラジカル発生を抑制し、動脈硬化を治療/予防できる可能性がある。

2. 超高齢社会の到来

我々がラクトフェリンの抗動脈硬化作用に注目しているのは、人類未踏の超高齢社会が目前に迫っているからである。図1に示す1950年と2050年との人口動態を比べれば一目瞭然のように、わが国は急速に老化しつつあり、僅か百年経過した2050年の年齢別人口分布は、もはやピラミッドではない。2050年は底辺の出生数が異常に少ない「少子社会」で、男女とも80歳前後の後期高齢者が最多層を形成する。古来百歳を越える長寿者は稀だったが、2050年には百歳以上の高齢者が数十万人に達し、少しも珍しくなくなるのである。超高齢社会が目前に迫り、「何かしら恐ろしい社会変動が起ころうとしている」のに、政治家から庶民にいたるまで“蛇に睨まれた蛙”のように思考が停止し、超高齢社会へ対応は一向に進まない。

わが国の平均寿命は戦後の食生活の改善などによって飛躍的に伸び、いまや世界有数の長寿国となった。その反面、生活習慣病の発症率は高齢になるほど高まり、これに起因した

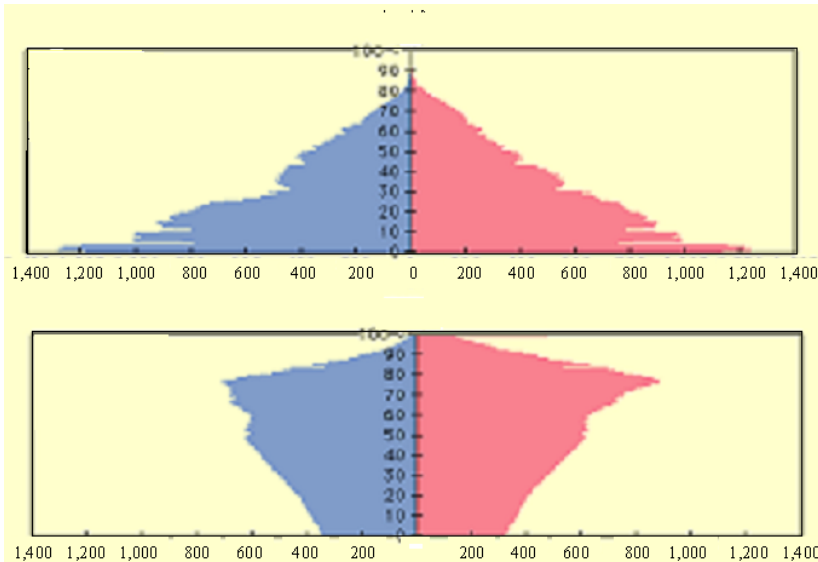


図1. 1950年(上)と2050年(下)の人口ピラミッド

青；男性、赤；女性。横軸；人数、縦軸；年齢

た寝たきりや認知症になる高齢者の増加は深刻な社会問題である。

明確なことは、若い働き手が減少するので、社会を支えるため高齢者も働かざるを得なくなることだ。おそらく、女性は85歳、男性は80歳くらいまで現役で働く覚悟が必要だろう。高齢者が高齢者を介護する時代になるので、高齢者の健康寿命延長が急務である。健康寿命とは、病気や痴呆、

衰弱などで要介護状態となった期間を、平均寿命から差し引いた寿命である。長寿国では一般に、平均寿命と健康寿命の開きが長く、わが国でも最晩年に寝たきりなどになる期間が平均6.4年以上に及ぶ。そのためには人類の二大死亡原因である「循環器疾患」と「がん」の発症を遅らせる予防/治療法の確立が急務である。

しかし、わが国の現状を過度に悲観する必要はない。日本が超高齢社会の維持・発展に資するシステムの開発に成功すれば、それは新しい国力の源泉になることは間違いない。早晩、世界中が超高齢社会になるからである。今回は超高齢社会支援の一助として、ラクトフェリンが動脈硬化の発症と進展を遅らせることが可能かどうか考察することにした。

3. 酸化低比重リポたんぱく質(酸化 LDL)とマクロファージ

マクロファージはアセチル LDL あるいは酸化 LDL 等の修飾 LDL をスカベンジャー受容体経由で貪食することが知られている。それが時として泡沫細胞になるのである。この機作による泡沫細胞の形成は、動脈硬化が進展してゆく上で鍵となる役割を演ずると信じられている。いろいろな修飾 LDL のなかでも、ヒト動脈硬化病巣から直接的に分離される酸化 LDL は、生体内で動脈硬化を起こす主要なリポたんぱく質である。酸化 LDL とは対照的に、泡沫細胞からコレステロールを運び出す高密度リポたんぱく質 (HDL) は、動脈硬化を抑制する作用があると考えられている。これをコレステロール逆輸送と呼んでいる。遊離のリポたんぱく質、例えば、アポリポたんぱく A-I、A-II およびアポ E は、泡沫細胞化したマクロファージからコレステロールを運び出す事に関与している。

前号で紹介したように、ゴールドスタインとブラウンは、アセチル化 LDL を含む培地でマクロファージを培養すると、細胞内のコレステロール・エステル (ChE) が有意に増加し、マクロファージは泡沫細胞に変換されることを発見した。この発見が契機となり、北等は修飾 LDL の本体を酸化 LDL と同定した。

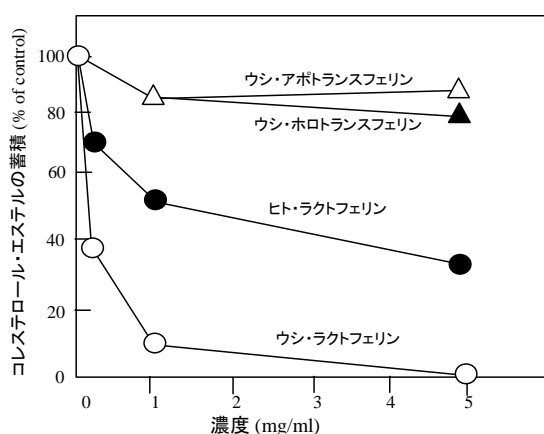


図 2. マクロファージのコレステロール・エステル蓄積に及ぼすラクトフェリンの影響

ちなみに、酸化 LDL を調製する方法は簡単である。まず、LDL の生理食塩水溶液に 5 μ M の硫酸銅を加え、37°C で 24 時間インキュベートする。24 時間後、溶液に 1mM の EDTA を加えて反応を止め、冷却下に PBS で透析して銅イオンを除去する。一価と二価のあいだを往復して、ヒドロキシル・ラジカル (強烈な酸化剤) 生成を触媒するフリーの銅イオンとは異なり、キレート結合した銅イオンは、触媒作用を喪失するからである。これらの事実は、培地に微量に溶存する酸素が励起され、2 価銅イオン存在下でヒドロキシル・ラジカルに変換されることを示唆する。つまり、老化が酸化ストレスによって促進されることがわかり、酸化 LDL の生成抑制は、動脈硬化の治療・予防を可能にするのではないかと考えられるようになった。

松田等⁽²⁾ はマクロファージへの ChE 蓄積に及ぼすホエイたんぱく質の影響を検討し、ホエイの微量成分であるラクトフェリンが用量依存性に ChE の蓄積を抑制することを発見した。培地にウシ・ラクトフェリン (b LF) を 1 mg/ml 添加すると、マクロファージに蓄積する ChE は大きく減少する。しかし、ヒト・ラクトフェリンはウシ・ラクトフェリン (b LF) より抑制活性が低く、ウシ・トランスフェリンはまったく効果がない。したがって、この抑制効果は高度に特異的である(図 2)。さらに、¹²⁵I-アセチル LDL のマクロファージへ

の結合は、ラクトフェリンによって阻害された。アガロースゲルの電気泳動によりラクトフェリンが酸化 LDL に結合し、それらのマイナス荷電を中和すると、酸化 LDL・LF 複合体はマクロファージのスカベンジャー受容体に結合しなくなるのである。

一方、LF のアルギニン残基に 1,2-cyclohexanedione を結合させた修飾ラクトフェリンは、酸化 LDL に結合する能力を大きく喪失する。この事実は LF の N 末端に近く塩基性アミノ酸に富む領域がスカベンジャー受容体のリガンド結合部位と似ていて、酸化 LDL との結合にとって必須であることを示す。これらの結果は生体内で LF が動脈硬化の治療・予防薬として作用する可能性を示唆している。

前の研究に続いて松田等^③は、ヒトのリポ蛋白除去血清(LPDS)がマクロファージによる酸化 LDL の貪食を阻害するかどうかを検討した。すなわち、ヘパリンカラムクロマトにより LPDS を分画し、カラムに結合する分画と結合しない分画の阻害作用を調べた。その結果、酸化 LDL のマクロファージへの結合と貪食は、ヘパリンに結合するたんぱく質分画により阻害されるが、ヘパリンに結合しない分画は酸化 LDL の貪食に影響がないことを証明した。さらに、酸化 LDL およびヘパリンに結合する LPDS 分画をセファクリル S-300 ゲル濾過クロマトグラフィーにかけると、150-kDa の蛋白が酸化 LDL と結合していることがわかった。これらの結果はヘパリンに結合する血清蛋白質分画のあるものが、酸化 LDL と電気的に相互作用し、マクロファージ・スカベンジャー受容体による酸化 LDL のアップテイクを妨害するのである。

LF がヘパリンおよびヘパリン様構造を持つ高分子に結合する現象は、LF によるトリプターゼ活性の阻害様式に類似する。トリプターゼはマスト細胞顆粒内に豊富に含まれる中性セリンプロテアーゼで、アルギニン-リジン残基間でタンパク質を切断する。トリプターゼはマスト細胞顆粒に保持され、活性化により放出される。マスト細胞は様々な組織に存在するが、呼吸器、消化器、血管の周辺組織など、上皮の裏側に多く存在する。また、即時型知覚過敏、遅発型知覚過敏、細胞増殖制御、新組織形成に対する防御、痛覚、かゆみ感など生理学的、病態生理学的に深く関与する。さらに、慢性炎、神経/免疫相互作用にも関連している。近年、トリプターゼはヘパリン様構造が束ねる四量体であることがわかり、LF がヘパリン様構造に結合してモノマーに乖離させると失活することがわかった。LF が酵素に結合すると、四量体を束ねる構造を失活して一挙に単量体へと分離し、酵素活性を失うのである。

したがって、LF によるマクロファージの泡沫細胞化阻害は、次の三経路によると考えられる。

- (1) LF と遊離銅イオンとのキレート形成による LDL の酸化阻害、
- (2) LF・酸化 LDL 複合体形成によるマクロファージ・スカベンジャー受容体への結合阻害、
- (3) LF とスカベンジャー受容体との結合による酸化 LDL の貪食阻害。

4. ロスバスタチンと高感度 CRP

ここでは薬物投与により寿命を延長する試みを紹介する。読者は塩野義製薬(株)が創出し、メガファーマのアストラ・ゼネカと共同販売している第三世代のスタチン、ロスバスタチンをご存知だろうか。これまでのスタチンが脂溶性だったのに対しロスバスタチンは水溶性で、その薬効は1兆4千億円の売上を誇るアトルバスタチンを凌駕するといわれている。リドカー (Ridker) 等は、LDL コレステロールは正常値だが、炎症のマーカーである高感度 CRP (CRP) が正常よりやや高い健常者にロスバスタチンを長期投与した二重盲検試験の結果を発表した(4)。

血中における炎症のバイオマーカーである高感度 CRP レベルは、心血管系の異常を予知するうえで有用である。スタチンは血清総コレステロール値と同時に CRP を低下させるので、彼等は CRP が高い健常者にロスバスタチンを投与するジュピターと命名した二重盲検試験を行った。この臨床試験は、中心となる医療機関が 1315 ヶ所、26 カ国にまたがる無作為、偽薬を対象とする二重盲検試験であり、メガファーマの一つであるアストラ・ゼネカ社の財政支援で行われた。

参加資格は、男性が 50 歳以上、女性が 60 歳以上で、過去に心血管病を患ったことがなく、最初に来院したときの検査値は、LDL コレステロールが 130 mg/dl 以下、CRP が 2 mg/l あるいはそれ以上、血清中性脂肪が 500 mg/dl 以下の健常者である。除外基準は、過去から現在にわたり脂質低下剤を内服したことがなく、女性では更年期障害治療のために女性ホルモン療法を受けたことがないこと、肝障害がないこと、クレアチニン・キナーゼ、血清クレアチニンが正常値、糖尿病、高血圧等の成人病がなく、5 年以内にがんの治療を受けたことがないこと、甲状腺機能低下症がないこと、アルコールないし麻薬の中毒歴がないこと、および試験期間を無事故で乗り切れることが参加条件である。本臨床試験のコアとなる仮説である“軽度の炎症が及ぼす影響”を検証することであるから、炎症性疾患、例えば、重篤な関節炎、ループス腎炎、炎症性腸疾患などは除外された。同様に、シクロスポリン、タクロリムス、アザチオプリンと長期のグルココルチコイド内服者も除外された。

この臨床試験は、2003 年 2 月 4 日から 2006 年 12 月 15 日まで行われた。総数で 89890 人がスクリーニングされ、このなかの 72088 人は不適格だった。残りの 17802 人を無作為にロスバスタチンと偽薬に 1 : 1 で振り分けた。投薬前には年齢、男女比、人種、BMI、血圧、喫煙率、虚血性心疾患の家族歴、メタボリック症候群の割合、アスピリン使用率、CRP レベル、LDL コレステロール、HDL コレステロール、中性脂肪、総コレステロール、空腹時血糖、ヘモグロビン A1c、腎糸球体ろ過速度などの背景因子について両群のあいだには差異がなかった。注目すべきことは、参加者の BMI が 28.3-28.4 でわが国の基準では肥満に該当すること、41.0-41.8%がアメリカ心臓病協会と NHLB の基準でメタボリック症候群と診断されていることである。

17,802 人の LDL コレステロールが 130 mg/dl 以下、CRP レベルが 2 mg/l か、それ以上

の健常人をランダムに 2 群に分け、**primary end point** は参加者が心筋梗塞および脳卒中の発症時点、冠動脈血行再建術(ステント挿入)、不定形狭心症のための入院および虚血性心疾患による死亡時点とした。

結果；臨床試験は中央値 1.9 年、最長 5 年で薬物投与を中止した。ロスバスタチンは LDL 値を 50%低下させ、高感度 CRP 値を 37%低下させた。参加者 100 人の 1 年あたりであらわした **Primary end point** は、ロスバスタチンが 0.77 および偽薬が 1.36 であった ($P<0.00001$)。心筋梗塞の発生は 0.18 に対して偽薬群 0.37 ($P<0.00001$)、脳卒中は 0.41 にたいして偽薬群 0.77 ($P=0.0002$)、冠動脈血行再建術と不定形狭心症に対して 0.45 に対し 0.85、総死亡は 1.00 に対して 1.25 であった ($P=0.02$)。ただし、担当医が報告する糖尿病の発症率は、ロスバスタチン群が有意に高かった ($P=0.01$)。

結論；高脂血症ではなく高感度 CRP が高い値の明らかに健康な人々を対象とした本臨床試験において、ロスバスタチンは主要な心血管病の発症を有意に抑制した。しかし、投薬により糖尿病発症率が有意に高まり、さらに、両群の総死亡率については顕著な改善はなかった。

5. ライオンによる腸溶性ラクトフェリン錠の二重盲検試験

ライオン株式会社は、京都府立医科大、京都市立病院、名古屋市立大と共同でラクトフェリンが、ヒトの内臓脂肪低減に有効であることを二重盲検臨床試験により確認している。同社は、ラクトフェリンを与えたマウスの内臓脂肪が減少している現象を見出した。これを契機として、ラクトフェリンと脂質代謝異常との関係性について研究をすすめ、ラクトフェリンが脂質代謝異常の改善に有効であることを確認した⁽⁵⁾。

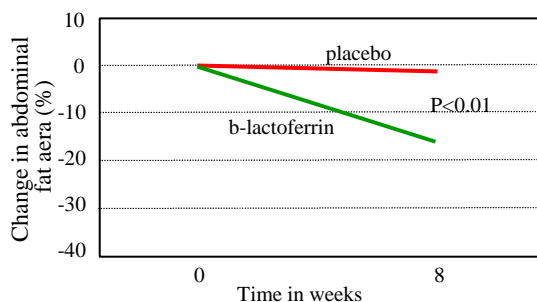


図3. 内臓脂肪面積の変化(cm)
赤; 対照群、緑; LF 群

「ラクトフェリン」の内臓脂肪低減効果を測定するため、年齢 30~62 歳、Body mass index (BMI) : 25 以上の成人男女 30 名を対象に、腸溶性ラクトフェリン錠 (1 日あたりラクトフェリン 300mg 相当) 摂取群とラクトフェリンの入っていない偽薬摂取群の 2 群に分け、2 ヶ月間摂取させ、摂取前後での CT 撮影による腹部脂肪面積^{*3} の測定と尿検査、4 週間毎の医師による問診、身長、体重、腹

を契機として、ラクトフェリンと脂質代謝異常との関係性について研究をすすめ、ラクトフェリンが脂質代謝異常の改善に有効であることを確認した⁽⁵⁾。

2008 年 10 月、ヒトの内臓脂肪に対する「ラクトフェリン」の低減効果を、二重盲検試験で証明するとともに、その効果メカニズムについて検証致した結果を発表しているので紹介する。

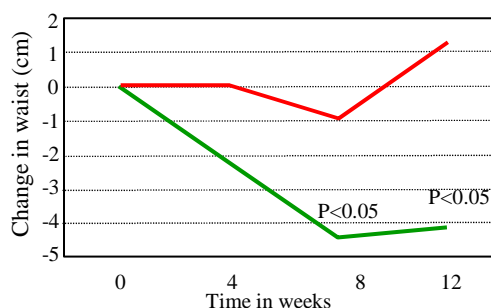


図4. 腹囲の変化(cm)
赤; 対照群、緑; LF 群

囲、臀部囲、血圧、血液検査、日誌及び食事、運動量を記録した。試験期間中の運動療法および食事療法は実施しなかった。

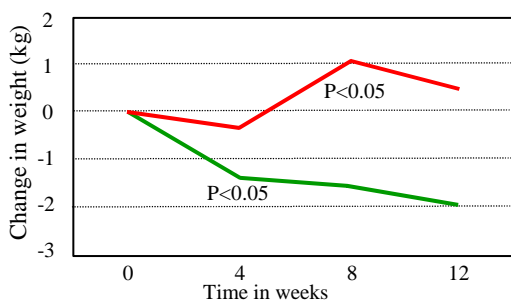


図5. 体重の変化 (kg)
赤; 対照群、緑; LF 群

その結果、腸溶性ラクトフェリン錠の 2 ヶ月間の摂取で、プラセボ群と比較して、CT 撮影による腹部内臓脂肪面積の平均値で 12.8cm² (p<0.01, 図)、及び腹囲 3.4cm (p<0.05, 図)、体重 2.5kg (p<0.05, 図) などの有意な減少を確認した。これらの結果より腸溶性ラクトフェリン錠はヒトに対して脂質改善効果を示すことが明らかになった。以上の研究結果により、当社は、多機能性タンパク質、ラクトフェリンが、メ

タボリック症候群の共通因子である蓄積内臓脂肪の低減に有効であることを、ヒトの臨床試験結果で確認するとともに、そのメカニズムとして、胃で分解されずに小腸まで届いたラクトフェリンおよびラクトフェリンのトリプシン分解物が、脂肪細胞の脂肪蓄積を抑制することを明らかにした。

6. ラクトフェリンの血中濃度とメタボリック症候群

スペイン・カルロス三世研究所のフェルナンデス・レアル等は、糖尿病が自然免疫を低下させることから、内因性ラクトフェリンの働きに注目した。ラクトフェリンは抗炎症作用と自然免疫の賦活作用があるたんぱく質で、しかも、動物実験では血清中性脂肪の低下、HDL コレステロールの上昇、LDL コレステロールの低下が報告されているからである。著者等は内因性の血中ラクトフェリン濃度、脂質代謝異常および血管の反応性の関係を検討した(6)。

すなわち、健康な白人男性(n=188)と耐糖能異常の男性(n=202)をストレスがかからない条件で採血と臨床検査を行い、血中ラクトフェリン濃度との相関を調べた。

血中ラクトフェリン濃度は(1)空腹時の血清中性脂肪濃度($r=-0.20$ 、 $P=0.001$)、(2)BMI($r=0.20$ 、 $P=0.007$)、(3)腹囲/ヒップ比率 ($r=-0.35$ 、 $P<0.001$)、(4)空腹時血糖($r=-0.18$ 、 $P=0.01$)と逆相関し、(5)HDL コレステロールと順相関($r=0.21$ 、 $P=0.004$)することを発見した。Rs1126477 の AG 対照は、空腹時の中性脂肪を有意に低下させる。このような相関は年齢、BMI、腹囲/ヒップ比率、空腹時血糖、喫煙、アルコール摂取を調整しても認められる有意差である。健常者のラクトフェリン濃度は血管内皮依存性の動脈弛緩(EDVD)とは相関しないが、耐糖能異常の肥満者では血中のラクトフェリン濃度と EDVD と正相関する($r=0.54$ 、 $P=0.04$)。そこで、彼らは血中ラクトフェリン濃度、空腹時血清中性脂肪、血管反応性は相関すると結論している。

52~53 回と酸素ラジカルと動脈硬化について、従来の治験をレビューして得た結論は次のとおりである。“酸化 LDL の研究からわかるように動脈硬化は、ヒドロキシルラジカルが関与する典型的な酸化ストレスである。これまで度重なる大規模二重盲検試験は、抗酸化ビタミンがラジカルを無害化できないことを証明してきた。ラクトフェリンのような遷移金属イオンのキレーターは、生体内でラジカル発生を減少させるので動脈硬化の予防/治療薬として期待できるのではなかろうか。現状でベストと思われるロスバスタチンでさえ、万全な予防/治療薬と呼ぶには程遠いからである”。

引用文献

- 1) Smith CA et al. **J Mol Biol.** 1991; 219:155-9.
- 2) Kajikawa M et al. **Biochim Biophys Acta** 1994; 1213: 82-90
- 3) Suginohara Y et al. **Atherosclerosis.** 1996; 120: 167-179
- 4) Ridker PM et al. **New Engl J Med.** 2008; 359: 2195-2207.
- 5) 鈴木則行等、第 28 回日本肥満学会講演、2008 年 10 月 17-18 日
- 6) Moreno-Navarrete JM et al. **Clin Chem.** 2008; 54: 301-309

校閲