

第 11 回：酸化ストレスとラクトフェリン

はじめに

これまでラクトフェリンに関する情報を 10 回連載でお届けしました。第 11 回と第 12 回は、ご紹介した情報をまとめた総集編です。それとともに、これから大きく発展するであろう“酸化ストレスとラクトフェリンの関係”をとりあげました。

2003 年、厚生労働省の発表によると、日本人女性の平均寿命は 85.33 歳、同じく男性は 78.36 歳です。女性は 19 年連続世界一という素晴らしい結果でした。その反面、超高齢社会の到来で女性は「人生設計は百歳まで」とする必要に迫られ、老化対策は避けて通れない最も重要なテーマになってきました。最近の研究から老化は「酸化ストレス」と関連し、酸化ストレスは、抗がん剤、紫外線を含む放射線、炎症、感染症、環境発癌物質、飽食、その他の原因によって起こることが明らかになっています。我々が日常生活の中でとくに意識することも無く吸っている空気は、生命活動に必要なエネルギーを産生するための酸素を供給する上で掛け替えのないものです。ヒトは、酸素分子を呼吸により吸収し、体内に取り込んだ食物成分を酸化してエネルギー(ATP)を生産し、生命活動を維持するために利用しています。この酸素の殆どは主としてエネルギー産生に有効利用されますが、残りの 0.4~4%程度が“活性酸素”に変換され、ヒトの体に悪影響を及ぼしています。



図 1. Ted Baker 教授
ニュージーランド・オークランド大教授。ラクトフェリンの X 線回折で画期的な業績をあげた。

一方、生体内で遊離した鉄、銅などのイオンは、過酸化水素、一重項酸素などから老化を促進するヒドロキシラジカルを生成させる触媒です。現在、ガン、高血圧・糖尿病・動脈硬化・心筋梗塞・脳卒中・痴呆といった生活習慣病の大半は、活性酸素やそれに由来するフリーラジカルおよび過酸化脂質などによる「酸化ストレス」が発症の要因とされています。

ラクトフェリンは遊離した三価鉄イオン、二価銅イオンをキレートして無毒化します。鉄イオンの触媒能をマスクしてヒドロキシラジカル産生を抑制することにより老化を予防するだけでなく、第 8 回の“眼の加齢とラクトフェリン”で述べたように、時の流れを逆転させ組織を若返らせる効果も期待

できることがわかってきました。ラクトフェリンによるアンチ・エイジング効果は、体内における重金属イオンのキレーション（錯化合物形成）と関係しているようです。そこでラクトフェリンと重金属イオンの関係について注目してみました。

ラクトフェリンは世界中の大学と研究機関が研究しています。それらは自発的な研究であり、営利企業のお先棒を担ぐ研究ではありません。大きな特色の一つは、二年に一度国際学会が開催され 150~200 人の研究者達が手弁当で参集することです。第一回のハワイに始まり、第 4 回は札幌、第 5 回はカナダのバンフ、第 6 回はイタリアのカプリ島、第 7 回

はハワイ、第 8 回はフランスの保養地ニースで開催されました。ラクトフェリンは漢方薬のように天然物ですが、有効成分が不明確な草根木皮ではありません。単一のタンパク質であり、確固とした科学的基盤に立って世界中の科学者が連携して研究しているテーマなのです。国際ラクトフェリン学会は X 線回折法によるラクトフェリン群タンパクの構造解明、生化学および分子生物学上の研究、薬理学、生理学、免疫学、ウイルス学、癌の基礎研究から臨床研究まで幅広く網羅する他流試合の場です。このように **multidisciplinary** な学会は、しっかりした中心人物がいないと散漫になりがちです。国際ラクトフェリン学会で中心となったのは、X 線回折法でラクトフェリン群たんぱく質の構造を解明したニュージーランド・オークランド大の **Ted Baker** 教授 (図 1) とカリフォルニア大デイビス校の **Lonnerdal** 教授でした。**Dr. Baker** が若手研究者だった頃に選んだ研究テーマは、酪農の国ニュージーランドに相応しいラクトフェリンでした。彼がラクトフェリンの結晶をつくり研究を始めた 1980 年代には、たんぱく質のように複雑な高分子結晶の回折像が得られる高エネルギー X 線装置は、ニュージーランドにはありませんでした。アジアで唯一装置があった筑波に出張し回折像を撮影していました。1980 年前半、筆者は彼が在籍していたマッセイ大を訪問したことがあります。その時、**Dr. Baker** は未発表だったヒト鉄飽和ラクトフェリンの構造を示す写真 (図 2) と 1m^3 もありそうな紙でつくった立体模型を見せてくれました。7 百個以上のアミノ酸を紙で切り抜き、貼り合わせた模型は、途方もないエネルギーを注ぎ込んだ労作でした。鉄イオンが二つペプチド球の中心に鎮座した模型から、背後に何か凄まじいことがあるのではないかと思いましたが、それが何であるかは最近まで思い至りませんでした。

X 線回折像が示唆するもの

面白いと思った理由は、筆者も X 線回折で抗生物質の構造を解明する研究者の端くれだったからです。我々が発見し X 線回折により構造を決めた抗生物質の一つにナクチン系のテトラナクチンがあります。この物質は 1973 年に事業化されて以来、世界で唯一の実用化されている農業用殺虫抗生物質で、お茶、蔬菜、果樹のハダニ防除に使われています。図 3 のよ

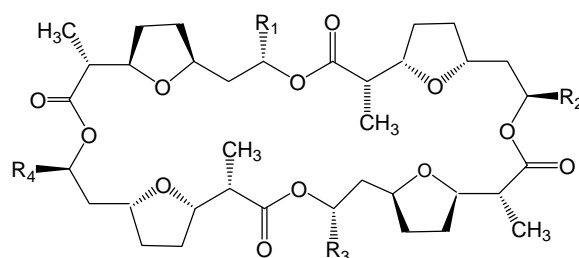


図 3. ナクチンの構造

R1~R4 はメチル基ないしエチル基。

うに 32 員環の環状ポリエステルでナトリウム、カリウム、ルビジウム、セシウムなどのアルカリ金属イオンとキレートをつくる性質があります。ただし、リチウムはイオン半径が小さいのでキレートをつくりません。この分子はアルカリ金属イオンと遭遇すると、32 員環がテニスボールのシームのように球状に丸まり、中心にアルカリ・カチオン包み込みます。球の表面はメチル、エチル、メチレンのような脂溶性基で覆われ、酸素はカチオンと静電的に引きあって内側に向いています。アルカリ金属塩はベンゼン、クロロフォルムな

どの有機溶媒に溶けませんが、ナクチンとキレートするとよく溶けるようになります。そのキレートはアルカリ金属カチオンが脂質二重層からなる生体膜を通過するモデルとなり、この分野のリーダーだったデュポンの C.J ペダーセン博士は、1987年にノーベル化学賞を受賞しました。余談ですがペダーセン博士は日本に駐在したキリスト教宣教師の子息で、母親は日本人でした。

フェントン反応

それではラクトフェリンが重金属イオンと強固なキレートをつくる性質は、どのような意義を持っているのでしょうか。ナクチン類と同様に、ラクトフェリンの極性基は鉄イオン、銅イオン等の重金属イオンと相互作用し、図2に見られるように内部に包み込み、他の鉄キレート剤に見られないほど強固なキレートをつくります。一方、鉄はヘモグロビン、銅はチトクロームC酸化酵素、スーパーオキシド・ディスマターゼ(SOD)の構成要素で生体に必須ですが、

遊離した1価銅イオンと2価鉄イオンはフェントン反応の触媒です。図4に示すとおり、これらの重金属イオンは触媒の役割を果たすと、それぞれ2価と3価に酸化されますが、過酸化水素あるいは一重項酸素から電子を受け取り、直ちに1価銅イオンと2価鉄イオンを再生します。つまり、このヒドロキシラジカルの生成は連鎖反応です。フェントン反応の場にラクトフェリンが存在したらどうでしょうか。2価銅、3価鉄イオンが遊離するやいなや、直ちにラクトフェリンとキレートを形成し、重金属イオンは反応系外に除去されます。言い換えれば、ラクトフェリンは *in vitro* でフェントン反応を阻害するのです。問題は経口摂取されたラクトフェリンが、*in vivo* でフェントン反応を阻害するかどうかです。

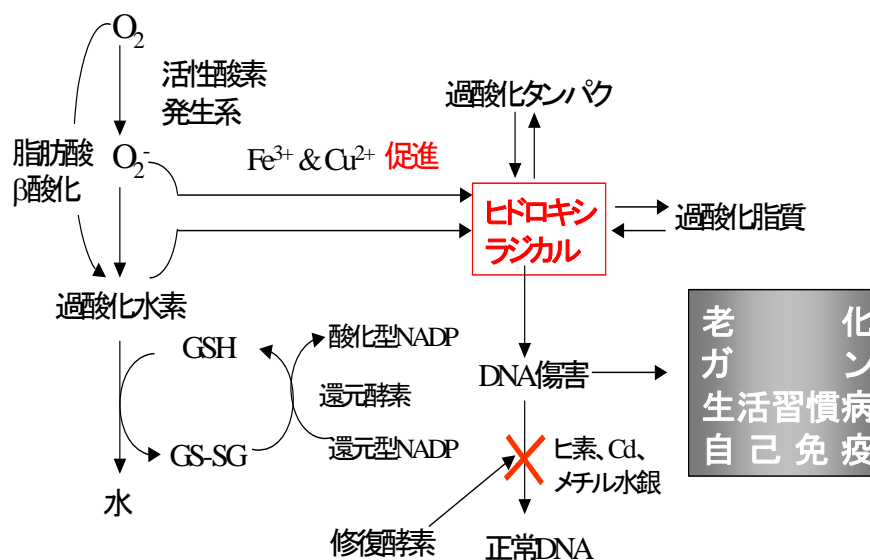


図4. フェントン反応によるヒドロキシラジカルの産生

イオンを再生します。つまり、このヒドロキシラジカルの生成は連鎖反応です。フェントン反応の場にラクトフェリンが存在したらどうでしょうか。2価銅、3価鉄イオンが遊離するやいなや、直ちにラクトフェリンとキレートを形成し、重金属イオンは反応系外に除去されます。言い換えれば、ラクトフェリンは *in vitro* でフェントン反応を阻害するのです。問題は経口摂取されたラクトフェリンが、*in vivo* でフェントン反応を阻害するかどうかです。

ラクトフェリンが三価鉄イオンとキレートをつくる性質は、病原菌増殖に必要な鉄を環境から除去し、感染症の予防に役立っていると云われてきました。ラクトフェリンはいろいろの生理活性がある多機能たんぱく質です。抗菌作用を除くその他の生理活性は、重金属をキレートする性質と無関係と考えられていました。しかし、鉄および銅の過剰蓄積が

いろいろの病態の引き金になること、重金属の蓄積が老化を促進するヒドロキシラジカル産生を加速すること等がわかってきて、重金属イオンとキレートする性質が注目されるようになってと思います。多機能の根底にある一義的な作用機作は、重金属とのキレーションにあるのではないかと考えられるのです。

鉄の蓄積は寿命を縮める

世界的に女性の平均寿命は男性を上回り、先進国では7~8歳の差で女性優位になっています。なぜ男女で寿命に差が出来るのでしょうか。女性は男性より女性ホルモンの恩恵に浴しているのです、長寿に恵まれると云う説が有力です。これに加えて、もう一つ、女性の長生きを後押しするのは、女性の方が男性より鉄の毒性に曝され難いことです。試験管レ

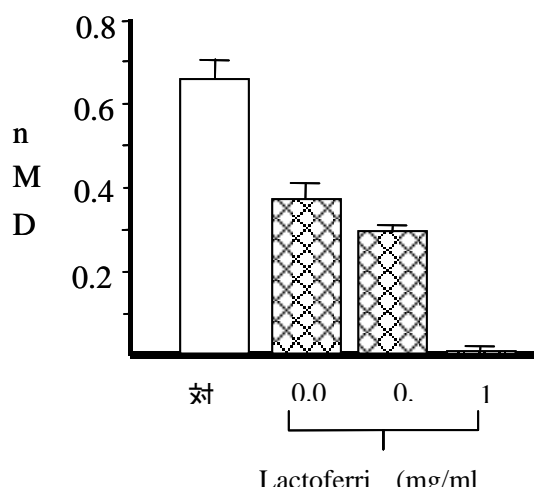


図5. ラクトフェリンの抗過酸化作用

卵黄リン脂質リポソームにアスコルビン酸および硫酸鉄アンモニウムを添加すると、対照と比べ著しい脂質の過酸化が起こる。しかし、この系にラクトフェリンを添加すると、脂質の過酸化は用量依存性に抑制された。過酸化脂質はマロンジアルデヒド相当量(MDA)と示した。

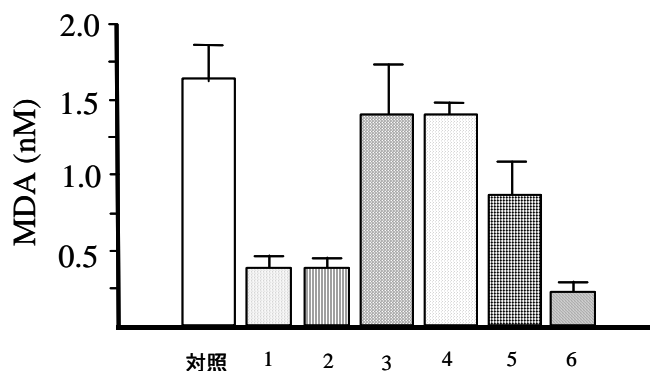


図6. 抗過酸化効果の比較

図3と同じ実験系に1 mg/mlのラクトフェリン(1)、スーパーオキシド・ディスムターゼ(2)、マンニトール(3)、2-メルカプトエタノール(4)、EDTA(5)、ビタミンE(6)を添加し、生成する過酸化物を測定。

ベルですが、ラクトフェリンが鉄による過酸化物生成を抑制するかを検証してみます。図に示すようにラクトフェリンは鉄とアスコルビン酸添加による卵黄リン脂質リポソームの多価不飽

和脂肪酸の過酸化反応を用量依存性に抑制します。右側の図は抗酸化物質の強さをラクトフェリンと対比して示しました。注意しなければならないことは、この実験は質的に異なる現象を見ていることです。ラクトフェリンとEDTAは鉄をマスクすることにより触媒活性を失わせる効果、SODはスーパーオキシドの消去効果、その他は自身が酸化されることにより多価不飽和脂肪酸の過酸化を妨げる効果です。したがって、ラクトフェリンとSODがビタミンEより抗酸化能が弱いと云うことにはなりません。

更年期を迎えるまでの女性には生理があり、定期的に血液中に含まれる鉄を放出しているので、男性と比べ体内に鉄が蓄積し難く、その有害作用を受け難いと考えられます。逆に男性は、女性ホルモンの恩恵をこうむることもなく、定期的な鉄の喪失も起こりません。

自然な保護作用がないのです。男性は体内でフェントン反応が頻発し、活性酸素が発生しやすい状況にあり、女性と比べ酸化ストレスによる老化促進から寿命の短縮が起こりやすいのです。寿命に男女差があるのは当然といえましょう。

重金属の蓄積と密接な関係がある病態

フェントン反応は、DNA を傷害し老化、発ガン、生活習慣病、神経変性疾患等の原因になっていることがほぼ間違いありません。それ以外にも鉄とか銅の過剰蓄積と深い関係がある病態が幾つか知られています。最も有名なのは 10 万人に一人の割合で起こる遺伝性の銅代謝異常ウイルソン病です。また、C 型肝炎の悪化、HIV 感染によるエイズの発症も体内への鉄の過剰蓄積と関係があります。さらに、アルツハイマー病、パーキンソン病、てんかん、多発性硬化症、ハンチントン病などの種々の神経変性疾患と脳内の鉄蓄積との関連性が明らかになりつつあります。図 7 と図 8 に示すようにアルツハイマー病患者の脳には多量の二価および三価鉄が蓄積し、強い酸化ストレスが起こっていることがわかります。さらに、アルツハイマー病脳のアミロイド斑には、免疫染色によりラクトフェリンが存在

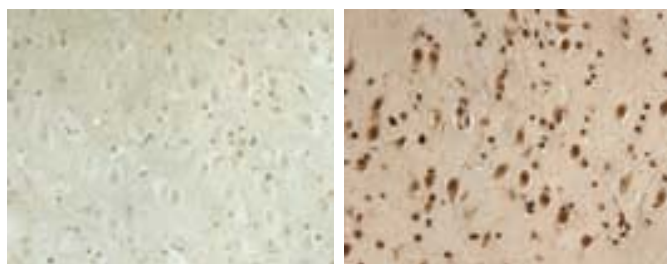


図 7. ヒト脳のパラフィン包埋組織切片における二価鉄の検出

左；正常、右；アルツハイマー病患者の脳。褐色のスポットは蓄積した二価鉄。

www.funakoshi.co.jp/STR/050516_STR13s.phpから転載

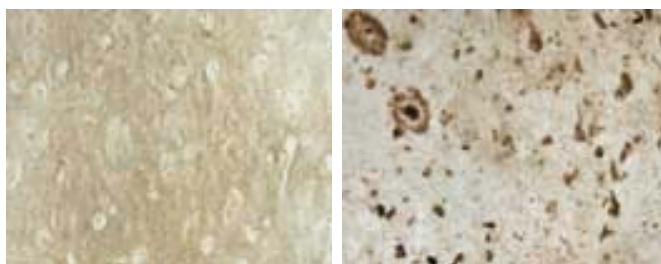


図 8. ヒト脳のパラフィン包埋組織切片における三価鉄の検出

左；正常、右；アルツハイマー病患者の脳。褐色のスポットは蓄積した三価鉄。

www.funakoshi.co.jp/STR/050516_STR13s.phpから転載

することが報告されています(2)。つまり、アルツハイマー病患者の脳には、ラクトフェリンを送り込み、鉄をキレートして酸化ストレスを回避しようと懸命に努力した焼け跡が残っているのです。さらに、神経変性疾患と鉄との相関は、ラットの脳内に微量の鉄イオンを注入するとてんかん様の症状を起こすことからわかります。

最近、C 型肝炎の治療法の一つとして、瀉血が行われ話題になっています。C 型肝炎は肝硬変から肝ガンへと高い確率で移行することが知られていますが、肝臓に過剰の鉄が蓄積すると、肝硬変から肝ガンへの過程が促進されると言われます(2,3)。ここでも、フェントン反応による活性酸素の発生が関与しているようです。過剰の鉄を減らし肝炎から肝ガンへの進展を予防するため、鉄分の少ない食事や「瀉血」が試みられ成果を上げているのです。

酸化ストレスは HIV-1 が感染して起こるエイズとも関係しています(4,5)。HIV-1 が感染すると発現するたんぱく質 Nef はラクトフェリン同様に多機能たんぱく質で、Nef が欠損

する HIV-1 は感染 10 年を経過してもエイズを発症しないことがわかっています。HIV-1 からエイズへ至る過程は鉄代謝異常が関係し、鉄の蓄積による酸化ストレスがエイズを悪化させます。最近、Drakesmith 等は Nef がマクロファージにおいて鉄代謝の恒常性を支配するタンパク質 HFE の細胞表層における発現を低下させ、鉄とフェリチンの蓄積を増加させることを証明しました。

経口摂取したラクトフェリンは脳に移行する

1990 年代、筆者等はラクトフェリン腸溶製剤を開発し、多数のボランティアに内服していただき効能・効果をテストしました。ラクトフェリンは育児用調製粉乳に混入することが認められ、さらに、ヨーグルトと牛乳に添加され販売されているので、倫理的な問題がなかったからです。このテストは動物実験では得られない多数の貴重な情報をもたらしました。予想通り免疫賦活に基づく作用が報告されてくるなかで、うつ病、ひきこもり、テンカン、パーキンソン病等の精神障害に対し改善効果があるという報告が上がってきたのには驚きました。ラクトフェリンは分子量が約 8 万の高分子であり、腸管から吸収されるかどうかは定かではありません。さらに、体内に取り込まれ、血液脳関門を越えて脳内に移行することは想像もできなかったのです。したがって、それはプラセボ効果であろうと考えたのです。病態によっては暗示によるプラセボ効果は非常に大きく、消化性潰瘍のようにプラセボの有効率が 90%を超えることすらあります。しかし、主催者でさえ精神障害

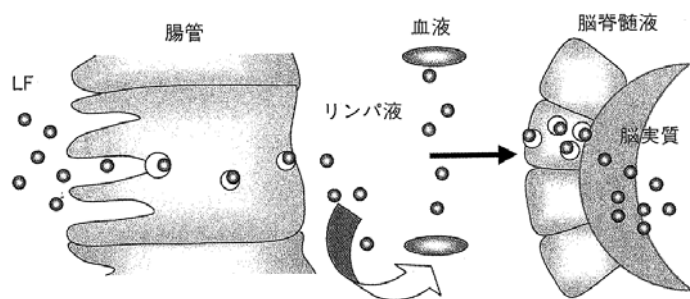


図 9. 消化管吸収ラクトフェリンの脳内移行

に影響を及ぼすとは考えていなかったのですから、被験者に暗示を与えたことはありません。

最近になって謎が少しずつ解けてきました。血中の鉄輸送蛋白であるトランスフェリンは、以前から血液脳関門 (BBB) を越えて脳脊髄液に移行することが知られていました。そこでト

ランスフェリンに猛毒のタンパク質であるリシンを結合させた脳腫瘍の治療薬が開発中です。BBB を突破して脳神経に特定のクスリを送り込むのは至難の業なのです。トランスフェリン・ファミリーに属するラクトフェリンは構造が似ていますから BBB を越えて脳神経に現れるだろうと誰でも想像します。事実、そのとおりで 1999 年にラクトフェリンが BBB を越えることが報告され、われわれも、それを確認しています。今年に入り国立放射線医学研究所の研究者が、¹²⁵I 標識したラクトフェリン、トランスフェリンおよび抗ラクトフェリン抗体を用い、ラクトフェリンがトランスフェリンよりはるかに早く脳内の取り込まれることを報告しました(7)。ラクトフェリンがアルツハイマー病を始めとする神経変性疾患を治療・予防できる可能性が俄かに現実味を帯びてきたのです。

ラクトフェリンは LEC ラットを延命させる

表 3. Lec ラットの寿命に及ぼすラクトフェリンの影響

実験群	生存	死亡	統計的有意差
対照群	1	9	P<0.002
ラクトフェリン群	8	2	

Lec ラット雌使用。ラットは日本クレアの標準飼料、CE-2 と飲料水を自由に与えて飼育。ラクトフェリンは飼料に 0.2%混合した。36 週現在の生存数を示す。

が蓄積し生後 20 週あたりから 30 週までに雌が 80%、雄が 40%劇症肝炎で死亡し、生き残りも生後 1 年以内に 100%が肝臓ガンを発症して死亡します。Lec ラットにラクトフェリンを 2%混合した飼料を 36 週間与え、飼育した結果は表に示すとおりでした。経口投与してもラクトフェリンは遺伝性の難病に効果を発揮することが確認されたのです。

Lec ラットに酷似したヒトのウイルソン病も、肝臓の銅排泄能に遺伝性の障害があり、銅と鉄が蓄積するため劇症肝炎と神経障害を起こします。この遺伝病はかつて子供に劇症肝炎を起こさせる致死的な病気でした。今では蓄積した銅を排泄させるペニシラミン、あるいは銅と鉄の吸収を阻害する亜鉛を服用することにより延命できるようになりました。困ったことに、ウイルソン病の患者は、鉄も蓄積します。そこで時々瀉血をして鉄を除去しなければなりません。この例からも、銅と鉄の蓄積が、身体に如何に大きな害を及ぼすかご理解いただけるでしょう。(続く)

引用文献

- (1) C. A. Smith, B. F. Anderson, H. M. Baker and E. N. Baker. Structure of copper- and oxalate-substituted human lactoferrin at 2.0 Å resolution. *Acta Cryst.* 1994; **D50**, 302-316
- (2) Leveugle B, Spik G, Perl DP, Bouras C, Fillit HM, Hof PR; The iron-binding protein lactotransferrin is present in pathologic lesions in a variety of neurodegenerative disorders: a comparative immunohistochemical analysis. *Brain Res.* 1994;**650**:20-31
- (3) Farid Azmoudeh Ardalan et al, Synergic effect of chronic hepatitis C infection and beta thalassemia major with marked hepatic iron overload on liver fibrosis: a retrospective cross-sectional study. *BMC Gastroenterology* 2004, **4**:17-21
- (4) E Boucher et al, Liver iron concentration and distribution in chronic hepatitis C before and after interferon treatment. *GUT* 1997;**41**:115-120

慈恵医大の坪田昭人博士は、LEC ラットを使いラクトフェリンが重金属による酸化ストレスを抑制することを証明しました(未発表)。LEC ラットはウイルソン病の病態モデルです。このラットは、ウイルソン病の患者と同様に肝臓から銅イオンを排泄する機能に遺伝性の欠陥があるため、銅

- (5a) Gordeuk VR et al, Iron status and the outcome of HIV infection: an overview. *J Clin Virol.* 2001; **20**:111-5.
- (5b) Georgiou NA et al, Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in human mononuclear blood cells by the iron chelators deferoxamine, deferiprone, and bleomycin. *J Infect Dis.* 2000;**181**:484-90
- (6) H Drakesmith et al, HIV-1 Nef down-regulates the hemochromatosis protein HFE, manipulating cellular iron homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; **102**: 11017-11022
- (7) Maeda et al, Pharmacokinetics and brain uptake of lactoferrin in rats. *Life Sci.* 2005; Sep 13, {Epub ahead of print}