

ラクトフェリンと劇症肝炎

腸溶性ラクトフェリン研究会

常任理事 安藤邦雄

はじめに

ラクトフェリンは分子量が約 8 万ダルトン、分子内に 2 個の遷移金属イオンをキレートする機能を持つ強塩基性蛋白質である。このミニレビューで扱うラクトフェリンは、牛乳から抽出精製したウシ・ラクトフェリンなので、文中ではb-LF (bovine lactoferrin) と略記することにした。b-LFは多機能性で、抗菌、抗ウイルス、免疫賦活、抗炎症、抗アレルギー、抗がん、脂質代謝改善、骨粗鬆症改善、酸素ラジカル発生抑制等々の作用を呈する。なかでももっとも注目されるのは、酸素ラジカル発生抑制効果であろう。酸素ラジカルは図 1 に示すように、老化と発ガンの誘発に始まり、肝臓、腎臓、脳神経、循環器、消化器、肺、免疫系、内分泌等々、あらゆる病態の発症・悪化に関与するからである⁽¹⁾。

ラクトフェリンはLECラットの酸化ストレスを緩和する

2006 年 11 月に開催された第二回ラクトフェリンフォーラムで、慈恵医大の坪田昭人准教授等はb-LFの抗酸化ストレス作用について画期的な研究成果を発表した⁽²⁾。彼らはヒト・

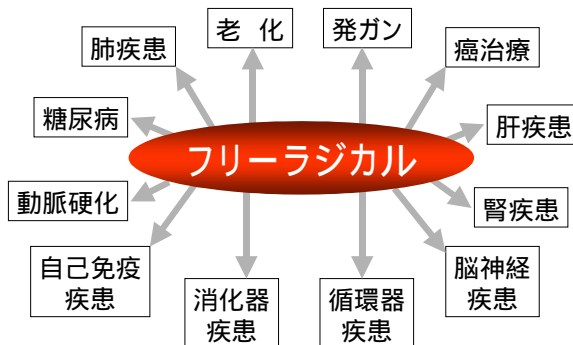


図 1.フリーラジカルが発症と悪化の原因となる疾患

ウイルソン病のモデル動物、LEC-ラット⁽³⁾を使い、b-LFが酸化ストレスを緩和することを発見し、緩和のメカニズムを明快に証明したのである。LECラットはヒトのウイルソン病に酷似する病態モデルで、遺伝的に肝臓からの銅イオン排泄が障害され、肝臓と脳神経系に蓄積して劇症肝炎から肝臓癌を発症する。したがって、LECラットは単にウイルソン病の病態モデルにとどまらず、普遍的な酸化ストレスのモデルとして重要視される。

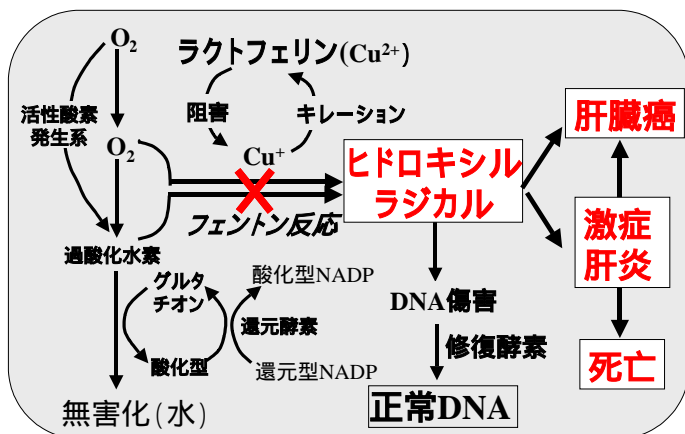
ミトコンドリアと活性酸素

ミトコンドリアは酸素を取り込んでアセチルCoAを燃焼させる細胞内小器官⁽⁴⁾なので、酸化還元にかかわる酵素の補助因子(cofactor)として鉄及び銅イオンを含み、消費される酸素の 0.4 ~ 4%を一重項酸素、過酸化水素等の活性酸素に変換する。活性酸素はグルタチオンにより水に還元され無害化されるが、蛋白質とキレーションしていない遊離の銅イオンが生ずると、図 2 のように活性酸素を有害なヒドロキシルラジカル(HO·)に変換する。フェントン反応と呼ぶ連鎖反応である。HO·は強力な酸化剤で、存在する時間はわずか 10⁻¹⁰秒以下、発生すると瞬時に周囲の蛋白質、脂質、核酸などを酸化する。図 2 に示すように、遊離の銅イオンは 1 価と 2 価を往復することにより触媒として働き、活性酸素が存在する

限りHO・を発生させ続ける。ビタミンE、ビタミンC、カロチノイド等の抗酸化剤は、発生するHO・をトラップし無害化できると信じられていた。ところが、大規模な二重盲検試験の結果、上記の抗酸化剤のHO・スカベンジング効果は幻想にすぎないことが明らかになった⁽⁵⁾。今のところ老化・発ガンに代表される酸化ストレスを免れるには、HO・を多量に発生させないようにする以外に方策がない。

研究成果の概要

LEC ラットはHO・に由来する酸化ストレスにより生後 12 週あたりから肝障害が発症し



始め、生後 17～18 週で雌性では 70%、雄性で 50%が劇症肝炎で死亡、生き残りも生後 1 年以内に 100%が肝臓がんで死亡する。坪田等は生後 4 週令の雌性 LEC ラットに 2%の b-LF を混入した飼料を与え続けると、下記の ~ に要約される変化が起こることを証明した。

図 2 . LEC ラットにおける銅イオン過剰蓄積と肝ミトコンドリアにおけるヒドロキシルラジカル発生

b-LF 投与は劇症肝炎による死亡を有意に阻止する(図 3)。

一方、b-LFは強力な銅イオンキレーター⁽⁶⁾であるにもかかわらず

肝臓への銅蓄積を阻害せず、AST, ALTの上昇を抑制しない。

肝臓切片の顕微鏡観察では、対照群は特徴的な多形成変性と脂肪変性を呈するが、

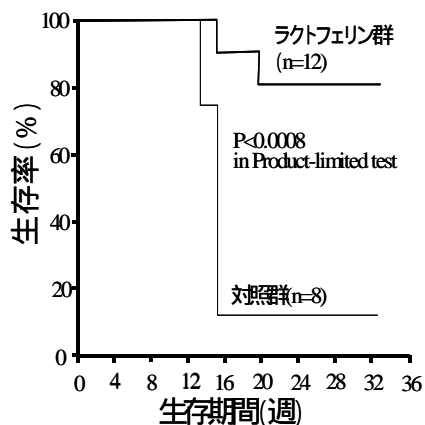


図 3 . b-LF は LEC ラットの劇症肝炎による死亡を抑制する

b-LF 群はこれらの変化が抑制された。また、透過型電子顕微鏡所見では、対照群においてミトコンドリアのクリステ数の減少、生体膜の不鮮明化が散見され、生体膜を構成する高度不飽和脂肪酸の過酸化促進を示唆したが、b-LF 群はミトコンドリアの分布密度が高く、対照群に見られた病理組織学的変化が抑制された。

酸化ストレス下のミトコンドリア DNA における代表的な酸化傷害の指標、8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)は、対照群で大きく増加したのに対し、b-LF 群は増加が有意に阻止された(図 4)。

肝組織内における DNA 修復酵素の一つ OGG1 の mRNA は、対照群と比べ b-LF 群のほうが 2.3～3.2 倍高値であった(図 5)。

OGG1 遺伝子プロモーター領域の CpG island におけるシトシンのメチル化度は、対照群で 25 ヶ所の CpG 部位すべてがメチル化をされていたのに対し、b-LF 群は 13 部位がメチル化を受けていたが、残りの 12 部位はメチル化されていなかった(図 6)。肝障害により死亡直前の対照群における肝組織内カスパーゼ-3 は大きく上昇していたが、b-LF は上昇を有意に阻止した。

銅イオンとのキレーションに関する考察

銅キレート剤であるペニシラミンが発見される前は、中年を越えて長生きするウイルソン病患者は稀で、ほとんどは、ウイルソン病が発見される前に肝障害と診断され亡くなっていた。患者が結婚と出産できるようになったのは、D-ペニシラミンが開発されて以降のことである。D-ペニシラミンはペニシリンの前駆物質 6-aminopenicillanic acid の分解物で、銅イオンと水溶性の錯化合物を形成する性質がある。副作用が強いため使い方が難しく、最近では毒性が弱い塩酸トレンチノイン、銅の腸管吸収を阻害する酢酸亜鉛等も併用されるようになった。つまり、本症の発症・悪化を予防するには、(1)銅イオンキレーターによる蓄積銅イオンの排泄促進、(2)食物由来の銅イオン摂取の制限と銅の腸管吸収抑制、(3)ヒドロキシルラジカルの発生抑制、(4)欠損した遺伝子を導入する遺伝子治療等が考えられる。(4)の遺伝子治療は現段階では難しいので、(1)~(3)が現実的な選択肢である。b-LF は

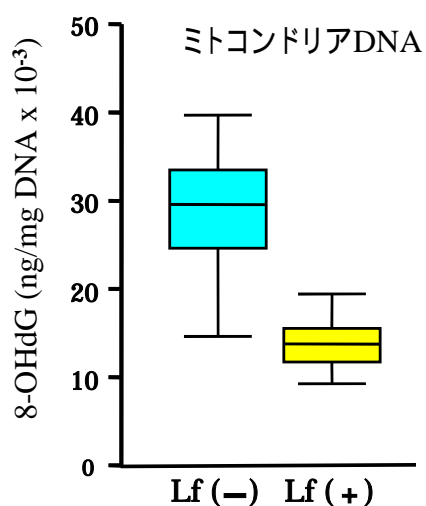


図 4 . ミトコンドリア DNA の 8-OHdG レベル

中央値 ± SE。Lf(-) ; 対照群、Lf(+); b-LF 群。P<0.05

銅イオン排泄を増加させないので、作用機作は従来のウイルソン病治療薬とは異なり、(3)の HO・発生を抑制が作用機作と考えられる。

酸化ストレス条件下で遺伝子に何が起こるのか

図 4 はミトコンドリア DNA における 8-OHdG レベルを示す。対照群ではミトコンドリア DNA の 8-OHdG が大きく上昇しているが、b-LF 群では上昇が有意に抑制された。この事実は b-LF がミトコンドリアにおける OH・発生を抑制したことを示唆している。

酸化された核酸塩基を除去し、DNA を修復する修復酵素活性には個人差がある。8-OHdG を除去し dG を嵌め込んで DNA を修復する酵素 OGG1 では一塩基多型 (single nucleotide polymorphism) が

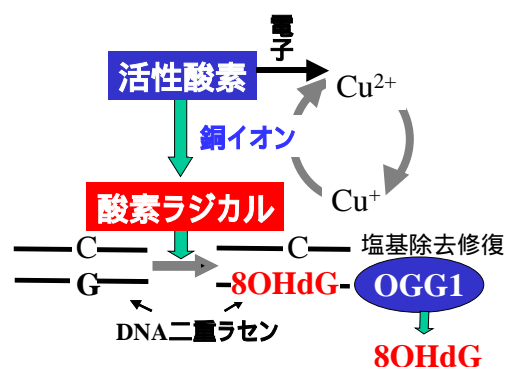


図 5 . OH・発生と OGG1 メッセンジャーRNA の発現

活性が強いセリンの場合と比べ肺扁平

上皮癌の罹患率(オッズ比)が約 4 倍である。つまり、発ガンと修復酵素活性は逆相関する。坪田等は LEC ラット肝臓のように強烈な酸化ストレス下では、図 5 に示すように 8-OHdG 除去修復酵素 DNA のメッセンジャーRNA(mRNA)への転写が大幅に減少するが、b-LF を与え続けると mRNA 量が保全されることを証明した。

修復酵素遺伝子の発現が酸化ストレス下でなぜ低下するのだろうか？彼らはこの点についても回答を与えた(図 6)。遺伝子から mRNA への転写は、プロモーター領域に蛋白質の転写因子が結合して開始される。哺乳類の遺伝子にはシトシンとグアニンが隣合う CpG 配列は少ないが、プロモーター領域は例外的に CpG が多く CpG island と呼ばれている。CpG island のシトシンがメチル化されると、組織特異的発現を制御する転写因子が作用できなくなるので、その遺伝子の発現が抑えられる。逆に脱メチル化されると、その遺伝子は活性化する。つまり、b-LF は DNA 修復酵素 OGG1 の遺伝子を発現可能な状態に保全する作用があることが明らかになった(図 6)。

で説明したように対照群の肝臓では HO・に誘発されたミトコンドリアの崩壊が起こっている。ミトコンドリアの崩壊によりシトクローム C が細胞質に溶出すると、カスパーゼ-3 の上昇とともにアポトーシスが起こる。対照群に認められるカスパーゼ-3 の上昇は、酸化ストレスにより肝細胞のアポトーシスに陥ったことを物語っている。

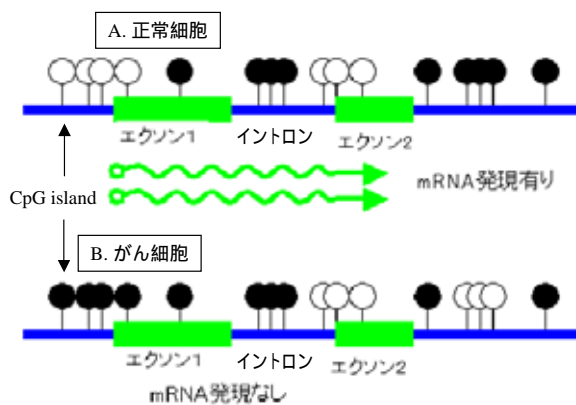


図 6 . OGG1 プロモーター部位の CpG island メチル化による細胞の癌化

発ガンと老化研究におけるミトコンドリア

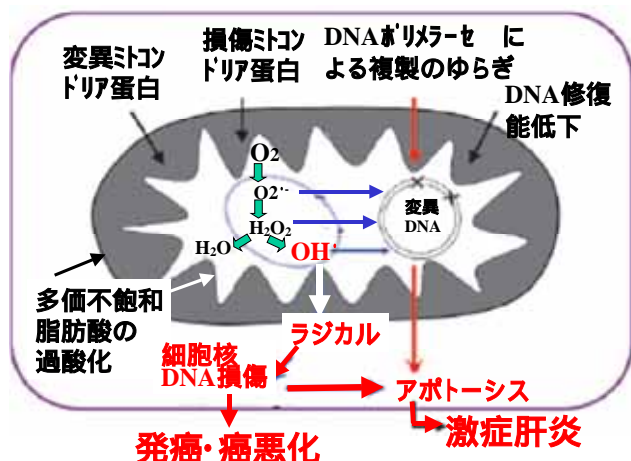


図 7 . ミトコンドリアにおけるヒドロキシル・ラジカル発生と蛋白質、生体膜脂質、DNAの過酸化⁽⁴⁾

近年、発ガンと老化に及ぼすミトコンドリアの役割が次第に明らかになってきた。マーティン等(Martin)⁽⁴⁾は飽食を続けると、図 7 に示す変化が徐々にミトコンドリアに起こると提唱している。この変化は酸化ストレスに曝されたLECラットのミトコンドリアに起こる変化と同じである。HO・はミトコンドリアの内膜と外膜を過酸化し、生体膜の機能を障害する。また、ミトコンドリア内の蛋白質もHO・と遭遇すれば、瞬時に酸化される。遺伝子レベルの変化はさらに深刻である。変異した遺伝子が転写・発現されれば、機能が不完全であったり、役割を果たさない変異蛋白質が生合成され

る。一方、坪田等が証明したように、ミトコンドリアDNAの修復能は大きく障害され、LECラットで明らかになったように修復能を全く喪失する事態も起こりうる。

がん研究における前世紀最大のトピックは、発ガンが遺伝子変異によって誘発されることが確定したことである。遺伝子の変異とは(1) DNAを構成する核酸塩基の酸化、DNAの断裂・転座等々、DNAそのものの変異と(2)図6に示した遺伝子プロモーター部位におけるCpG islandのepigeneticな変異である。国立がんセンターの津田(当時)等は、種々の実験動物発ガンモデルを駆使し、集中的なガン化学予防の研究を行った。その結果、b-LFはカロチノイド、多価不飽和脂肪酸、フラボノイド、お茶のカテキン等の化学予防剤と比べ、安全性の高さと予防できる癌腫の多様さからみてベストであると述べている⁽⁷⁾。

本ミニレビューは b-LF が遷移金属のキレーターとしてミトコンドリアで作用し、HO・発生を阻害することを前提として話を進めた。しかし、b-LF の消化管吸収については混乱した状態が続いており、b-LF が直接 DNA に結合するモデルも捨て難い。それにもかかわらず、経口投与した b-LF が肝ミトコンドリアにおけるヒドロキシル・ラジカル (HO・) 発生を抑制し、酸化ストレスを緩和することは確実である。この研究とこれから発表される続報は、癌、老化をはじめとする生物学に計り知れぬほど大きなインパクトを与えることになるだろう。

引用文献

- (1) 吉川敏一等、フリーラジカルとは善玉か悪玉か?、pp49、“フリーラジカル”近藤元治編、1992年刊行、メジカルレビュー社
- (2) 坪田昭人他、ラクトフェリン 2007 : 94-99、(株)日本医学館、2007年7月発行
- (3) Li Y, et al. J. Clin. Invest. 87: 1858-1861, 1991
- (4) Lawrence A et al. Proc Natl Acad Sci. 102: 18769-18770, 2005
- (5) 本誌 10月号、84-86 ページ、2007年参照。
- (6) Smith CA et al. Biochemistry. 31(18):4527-33. 1992
- (7) 藤田健一、津田洋幸、医学のあゆみ、204: 101-104, 2003