

## ラクトフェリンとリポ多糖 (LPS)

腸溶性ラクトフェリン研究会

常任理事 安藤邦雄

### ラクトフェリンと自然免疫

自然免疫はあらゆる動物に分布する免疫系で、体内への細菌やウイルスの侵入を察知し、異物排除を指令する生体防御系である。異物侵入を検知するセンサーである TLR(Toll-like receptor)は、ヒトからハエまで広く種をこえて保存された病原体の認識分子群である。ヒトでは 10 種類の TLR(TLR1-TLR10)が同定されており、各 TLR が各種の病原体構成成分を認識し、認識に引き続く免疫防御反応を誘導している。たとえばマクロファージ/樹状細胞表面に発現している TLR のうち TLR4 は蛋白質 MD-2 と共同してグラム陰性菌細胞壁の

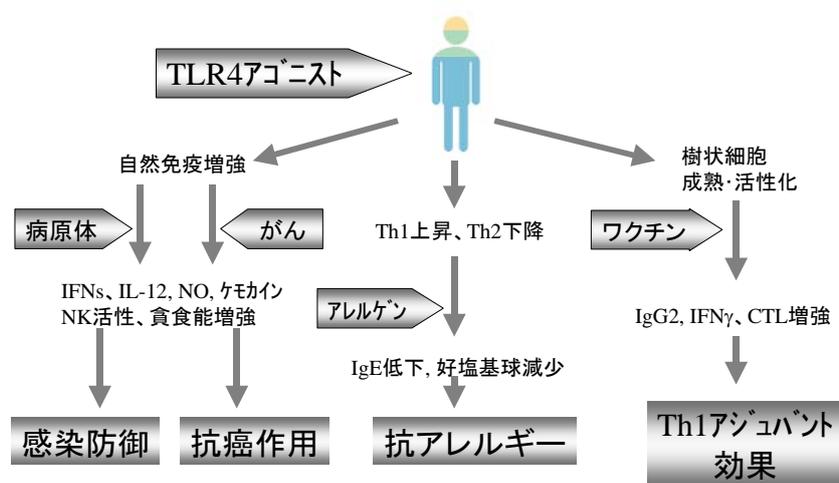


図 1. TLR4 アゴニストの作用

リポ多糖(LPS)を認識して図 1 の経路で生態防御系を発動する。TLR4 アゴニストはグラム陰性細菌の LPS である。大腸菌を代表とするグラム陰性細菌の LPS はエンドトキシンともよばれ、感染した患者に重症敗血症などを引き起こす。重症敗血症の有効な治療薬は未だなく、米国のみの統計でも、重症敗血症の死亡率は 29%と高く

年間の死者は 21 万人を超えると推定されている。LPS を認識して敗血症を起こすタンパク質は、宿主である患者の持つ TLR4 と MD-2<sup>(1)</sup>という受容体とされていたが、どちらが LPS を識別しているのかは不明であり、また、その立体構造も不明だった。その質問に回答を与えた三宅等の研究であった<sup>(2)</sup>。一方、ラクトフェリン (LF) は LPS の作用と拮抗することが、数多くの研究で報告されている。また、本誌でたびたび指摘してきたように LF は “感染防御”、“抗癌”、“抗アレルギー”、“自己免疫制御” 及び “Th1 アジュバント効果” 等々の作用面で LPS と共通している。例えば近ごろ注目され始めた LF の歯周病改善効果は、歯周病の病原菌の一つで歯肉に炎症を惹起する *Porphyromonas gingivalis* の LPS と LF が拮抗し、LPS の毒性を中和するためではないかと考えられるようになった。本誌 6 月号で解説したように、LF は旅行者下痢症の病原菌 *Plesiomonas shigelloides* から得られる LPS の活性成分リポ A のアジュバント効果を相乗的に増強する。つまり、LF と LPS はある場合には拮抗し、別の場面では相乗的に作用しているように見える。そこで今回は LF と LPS との関係について考えてみたい。

## LPS の構造

LPS はグラム陰性菌の主に桿菌で細胞壁表層に存在する脂質と多糖の複合体である。細菌には細胞質膜の外側に細胞壁がある。グラム陰性菌の細胞壁の内側はペプチドグリカン層で、外側は外膜で構成されている。脂質二重膜である外膜を構成するのが LPS である。

LPS の構造は複雑で、菌の外側には糖側鎖部分、内側にはリポド A 部分、この間を連結している糖鎖（コア多糖）の 3 つの部分から構成されている。温和な加水分解でリポド A 部分、コア多糖、末端の O 抗原多糖に分けることができる。LPS の生理作用発現は、宿主細胞の細胞膜表面に存在する TLR4 を介して行われことがわかってきた。

2007 年、三宅等は LPS 活性の発現に必須の蛋白質 MD-2 と LPS のリポド A 誘導体との複合体結晶を X 線回折法で解明し結晶構造を発表した<sup>(2)</sup>。複合体の構造を見ると、MD-2 にはリポドと非常に親和性の高い疎水性の深いポケットがあり、リポド IVa の脂肪酸の部分が入り口に完全に埋め込まれ、糖とリン酸基の部分はポケットの入り口から突き出している（図 3）。このことは、MD-2 と TLR4 の共受容体のうち、MD-2 がエンドトキシンのコアを識別することを示している。この研究で使われたリポド A は天然型ではなく、その前駆体のリポド A IVa 誘導体であった。

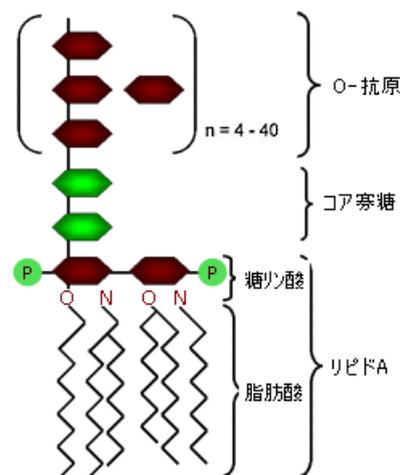


図 2. LPS の構造

O-抗原は多様性を持ち、分子量は 2,000~100 万ダルトン

リポド A は脂肪酸からなる部分で、遺伝的には高度に保存されている

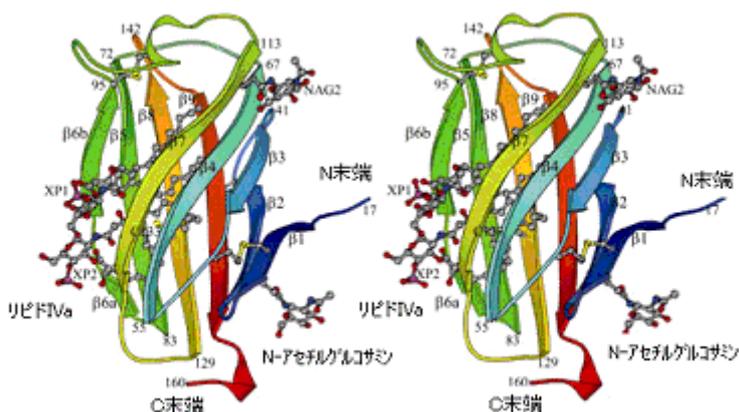


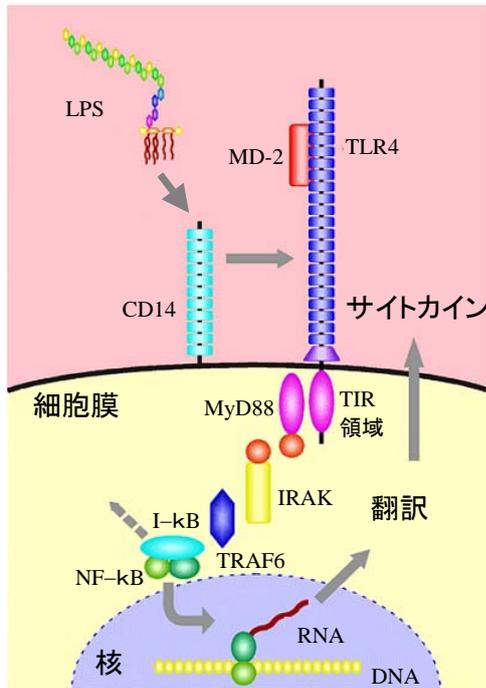
図 3. MD-2 とリポド A IV 複合体結晶の立体 X 線回折像

を示すことである。自然免疫を賦活し安全性が高く全身投与が可能な LF は、重症敗血症の治療に必須の条件をもっているため、治療薬としての高い潜在力を備えている。

面白いことにリポド A IVa と MD-2 の複合体は TLR4 に結合すると LPS の生理活性を阻害する。従って、リポド A の構造を TLR4 の活性阻害を指標として修飾・最適化すると、重症敗血症の治療薬が誕生するかもしれない。さらに、重症敗血症と LF との関係に興味をもたれるのは *in vitro* と *in vivo* で LF が LPS、特に、LPS の毒性本体であるリポド A と明らかな相互作用

### LPS の生理作用と活性の発現機構

LPS は動物に対して強い毒性をもち、内毒素（エンドトキシン）と呼ばれている。通常、細胞壁に強固に結合しているが、細胞の溶解が起こったときに遊離し、生体に様々な反応を引き起す。内毒素はタンパク毒素である外毒素と異なり、熱、乾燥、消毒剤に対して強い抵抗性を持ち高压滅菌しても破壊されない。毒素活性はリポド A 部分がほとんどを担っていると考えられているが、リポド A そのものは水に不溶なので、それだけでは活性がない。



多糖部分の強い親水性によりミセルを形成し、可溶化してはじめて活性を示す。LPS はまず血清のリポド結合蛋白に結合し、細胞膜上の CD14 に運搬され、さらに図 3 のように MD-2 蛋白の割れ目にリポド A が挿入された形で複合体を形成する。次に複合体は TLR4 に結合し、細胞内に LPS のシグナルを伝えることがわかってきた。TLR4 に結合した LPS は補体と線溶系を活性化し、サイトカインを放出させる。放出されたサイトカインは細菌を排除する方向に働くが、過剰になると宿主に毒性をしめし、ショック死を招くことがある。LPS が放出を促進するサイトカインは、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IP-6、IL-8、血小板活性化因子 (PAF) などであり、補体や凝固・線溶系の活性化や、傷ついた内皮表面への血小板の凝集などを通じ生体に多彩な作用を及ぼす。この経路でシグナルがマクロファージ/内皮細胞内に伝わると、炎症性サイトカインと一酸化窒素

図 3、LPS の作用機作

が分泌され、特徴的なエンドトキシンショックの状態におちいる。一方、LF は TNF- $\alpha$  産生を抑制し IL-10 産生を上昇させるので、産生を誘発するサイトカインのパターンは LPS とまったく異なっている。

## LPS の生理活性

表 1 に LPS の主要な作用を示した。主な作用は、(1) 炎症性サイトカインの産生亢進、(2) 補体カスケードの活性化、(3) 凝固・線溶系の活性化と (4) B リンパ球の分化・増殖の促進とプラズマ細胞からの抗体分泌を促進することである。

表 1. LPS の主要な作用

サイトカイン産生	IL-1、IL-6、IL-8、TNF $\alpha$ 、血小板凝集因子等が放出され、それに反応してプロスタグランジンとロイコトリエン産生が促進される。これらは強力な炎症誘発因子であり、エンドトキシン血症に引き続く敗血症ショックを引き起こす。LPS はマクロファージの貪食能と殺細胞活性を亢進させ、リソゾーム酵素、内因性の発熱素である IL-1、TNF $\alpha$ の産生と放出を促進する。
補体カスケードの活性化	活性化された補体 C3a と C5a はヒスタミンを遊離させ、血管平滑筋を弛緩させ、好中球の走化性を誘起させて局所に集積させる。その結果、炎症が起こる。
凝固・線溶系の活性化	最初にハーゲンマン因子（血液凝固の第七因子）を活性化し、引き続き線溶系を活性化するので凝固、血栓形成と急性の DIC が起こる。これらの反応が続けて起こると、血小板と種々の凝固因子が枯渇し、内出血が起こる。一方、LPS は補体の別経路も活性化し、その結果も炎症としてあらわれる。LPS はプラスミンも活性化するので、線溶系の亢進が起こり、出血が起こる。さらに、キニンが活性化してブラジキニンと血管作用性ペプチドを放出するので、低血圧が起こる。これらの反応がいつせいに起こった帰結は「炎症」、「血管内血液凝固」、「出血」、「ショック」である。
B リンパ球の分化・増殖・抗体産生	細胞分裂を促進するので、B 細胞のプラズマ細胞への分化と増殖を促進し、プラズマ細胞から IgG および IgM の分泌を促進する。

## LF の LPS に対する拮抗作用

LF と LPS の *in vitro* における相互作用を最初に研究した先駆者は、Broxmeyer で 1978 年のことであった<sup>(3)</sup>。それ以来、現在にいたるまで LF と LPS の相互作用はいろいろの見地から研究され、百を越える論文が発表されている。本章ではそのなかから代表的な論文を紹介したい。1994 年、Appelmelk 等は成熟好中球から分離した LF がグラム陰性細菌に対し抗菌作用を呈し、それとともに LPS を遊離させることを報告した。さらに彼らは大腸菌、肺炎桿菌、緑膿菌の臨床分離株からリピド A を単離し、LF が親和定数  $2 \times 10^9 \text{M}^{-1}$  でリピド A と結合することを証明している<sup>(4)</sup>。

翌年、Wang 等<sup>(5)</sup>は、好中球が異物を貪食する際に LPS を加えると発生する酸素ラジカルが増加する現象を研究した。ところが、予め好中球と LPS を 30 分以上インキュベートすると、新たに加えて好中球から発生する酸素ラジカルが激減する。彼等は原因物質を抽出・精製したところ、LF であることが明らかになった。すなわち、LF は可逆的に LPS の活性を阻害するのである。

以上は *in vitro* の実験だが、1998 年、Lee 等は初乳を飲ませない免疫的にバージンの豚新生仔を使い、大腸菌 LPS を静注して惹起されるエンドトキシン・ショックを LF が防御するかどうかを検討した。その結果、BSA を与えた対照群と比べ LF 群の死亡率は、73.7% から 16.7% に低下した ( $P < 0.001$ )。さらに LF 群は LPS による発熱も少なく、一般的な健康状態も良好だった。フローサイトメトリーを使った *in vitro* の研究により LF は用量依存性にブタ単球に LPS が結合するのを阻害した。つまり、LF は樹状細胞/マクロファージに LPS が結合するのを阻害し、LPS の結合によって惹起される炎症反応を抑制することが作用機作であろうと推定している<sup>(6)</sup>。

田中等はラットにガラクトサミンと LPS (Gal/LPS) を併用投与する劇症肝炎のモデルを用い LF の肝炎軽減効果を検討した<sup>(7)</sup>。実験は Gal/LPS 投与 24 時間前に LF を静注し、Gal/LPS 投与後の死亡率、血清 ALT、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、肝 TNF $\alpha$  mRNA、肝の病理組織学的検査、肝細胞のアポトーシスなどについて対照群との差異を検討した。その結果、対照群が 92 時間内に 12 頭中 11 頭が死亡したのに対し、LF 群は 12 頭すべてが生存し ( $P < 0.01$ )、血清における肝障害パラメーターの用量依存性の正常化、肝細胞の TNF $\alpha$  mRNA の減少、肝細胞アポトーシスの抑制等々、著明な病態改善効果を認めた<sup>(7)</sup>。さらに、急性肝不全に関与する TNF $\alpha$  分泌抑制、肝組織中のアポトーシス抑制作用が認められ、LF が臨床的にも肝炎の重症化や急性肝不全への進展を抑制する可能性を示唆した。

大槻等は<sup>(8,9)</sup>LPS によって誘発される実験動物の流産に対するヒト遺伝子組換え LF(rhLF) の効果を検討した。すなわち、雌性 C3H/HeN 系マウスと雄性 B6D2F1 一代雑種を交配し、妊娠 15 日目に 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の LPS を 3 時間おきに 2 回腹腔内投与した。またラクトフェリン (1  $\text{mg}/\text{mouse}$ ) は LPS 投与に先立つ 1 時間前に 2 回腹腔内投与した。血漿 IL-6 と TNF $\alpha$  は 2 回目の LPS 投与 6 時間後に採血して測定した。結果は表 2 に示すように LF 投与は流産にいたる時間を延長させ、血漿の TNF $\alpha$  と IL-6 を有意に低下させた。ヒト遺伝子組み

換えラクトフェリン(rhLF) はマウスの LPS 誘発性流産を明らか保護する。

表 2. 妊娠マウスに LPS を投与した際における反応

	流産日数 <sup>1)</sup>	血漿 IL-6 (pg/ml)	血漿 TNF $\alpha$ (pg/ml)
対照群	16.2 $\pm$ 0.4	1628 $\pm$ 115*	114 $\pm$ 49*
bLF 群	17.8 $\pm$ 0.3	1060 $\pm$ 154	88 $\pm$ 36
rhLF 群	18.0 $\pm$ 0.8*	244 $\pm$ 59	37 $\pm$ 30

<sup>1)</sup> 流産にいたるまでの日数。数値: Mean $\pm$ SE rhLF; ヒト遺伝子組換え LF、bLF; 牛乳から抽出した LF。この当時の bLF は品質が悪く、製造過程で LPS が混入して問題になった。現在では両者のあいだにはほとんど差がないものと思われる。

さらに、大槻等は LF が子宮頸部の分泌液と羊水に多量に含まれていることに着目し、LF が粘膜への病原菌感染に対し何らかの防御的な役割を果たしているのでは推定した。そこで妊娠家兔に大腸菌を感染させ、流産に及ぼす LF の影響を検討した。大腸菌を感染させる 2 時間前に rhLF を妊娠家兔の子宮頸部に投与し、次に同じ部位に大腸菌を感染させ、感染後に胎児の生存率と出産までの日数は表 3 に示すとおりである。

表 3. 大腸菌感染妊娠家兔の出産に及ぼす rhLF の効果<sup>(10)</sup>

	Fetus survival(%)	妊娠持続時間 (days)
健常対照	95.7	7.00 $\pm$ 0.00
大腸菌感染対照	0.0	3.25 $\pm$ 0.43
大腸菌感染 rhLF	32.6	4.85 $\pm$ 1.77

Mean $\pm$ SE.

妊娠家兔の子宮頸部に投与した rhLF は、大腸菌 LPS により誘発された炎症性サイトカイン産生を抑制し、死産及び流産の阻止に有効である。臨床でみられる子宮頸部感染症による早流産は、LF により阻止できる可能性があるとして示唆している。

一方、Talukder と原田は LPS を投与してマウスに誘発させた下痢症に対する LF の作用について報告した<sup>(11)</sup>。LPS は下痢と消化管への水分貯留を誘発し、活性炭末の消化管輸送を減少させるが、NOS 阻害剤の L-NAME あるいはインドメサシンは下痢と水分貯留は抑制する。その一方、この両薬剤は炭末輸送には影響がない。一方、LF は下痢症及び消化管への水分貯留を抑制するのに加え、活性炭の消化管輸送を促進する効果を示した。

これらの論文が示すように LF が LPS の作用と *in vitro* 及び *in vivo* で拮抗し、その毒性を軽減するのは確実である。これらの知見は LF の LPS による流産阻止の研究からもうかがえるように、広い応用範囲を持っている。例えば、当研究会は 10 年間も子宝に恵まれなかったカップルを始め、結婚 6-8 年を経た数組のカップルが腸溶性ラクトフェリン製剤の内服を始めて子宝を得た事例を知っている。これほどの期間にわたり妊娠しないと、殆どのカップルが子宝を諦めているのである。思いがけなく子宝を授かったカップルの喜びは察

するに余りある。我々の消化管には 100~150 兆個の腸内細菌が寄生していると言われる。これらは宿主が健康である限り消化管粘膜に付着して棲息しているが、軽度のストレスが加わるだけで **Bacterial translocation** を起こし体内に侵入することがわかっている。我々は日常的にグラム陰性細菌の **LPS** にさらされているのである。結婚したカップルの 1/10 は子宝に恵まれないのはそれゆえではなかろうか。

**MD-2** 蛋白と同様に疎水性の部分を持つ **LF** がリピド **A** と結合することも確かであろう。**LPS** と **LF** の複合体が **TLR4** と結合し、樹状細胞/マクロファージに何らかのシグナルを送っている可能性も考えられる。**LPS** と結合する抗生物質のポリミキシン **B** は毒性が強いので重症敗血症を救命する治療薬にはなりえない。昨年国際ラクトフェリンフォーラムでロシアでは人乳から抽出した **LF** を重症敗血症の治療薬として試用し、期待通りの成績を収めているという発表があった。**LF** はリピド **A** との結合力及び *in vivo* で **LPS** と拮抗する性質からみて、重症敗血症の治療薬として極めて有望であろう。

#### 引用文献

- (1) Nagai et al. *Nature Immunol.* 3: 667-671 (2002)
- (2) Ohto et al. *Science.* 316: 1632-4 (2007)
- (3) Broxmeyer et al. *J Exp Med.* 148:1052-67.(1978)
- (4) Appelmelk et al. *Infect. Immunity* 62: 2628-2632 (1994)
- (5) Wang et. al. *J Leukocyte Biol.* 57: 865-874 (1995)
- (6) Lee et al. *Infect Immun.* 66: 1421-6. (1998)
- (7) 松本秀平、田中克明. *Milk Science* 53: 265-272 (2004)
- (8) Sasaki et al. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 83: 1035-8. (2004)
- (9) Otsuki et al. *J Perinat Med.* 33: 320-3. (2005)
- (10) Hasegawa et al. *Am J Obstet Gynecol.* 192: 1038-43. (2005)
- (11) Talukder & Harada. *Can J Physiol Pharmacol.* 85: 200-208 (2007)