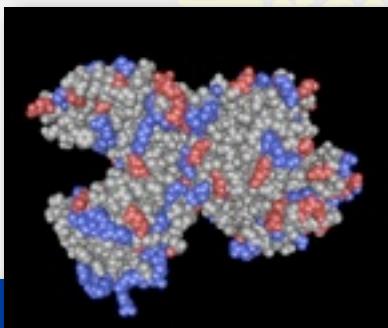


Lactoferrin NEWS

日本ラクトフェリン学会ニュースレター 第8号

2013年6月



1 卷頭言

効果的ながん予防物質としてのラクトフェリンを目指して

飯郷 正明

飯郷 正明

Masaaki Ilgo

名古屋市立大学大学院医学研究科

分子毒物学分野

2. 学会賞受賞研究紹介

反復強制水泳モデルマウスにおけるラクトフェリンの抗うつ効果

岩田 志穂

3. 総説

ラクトフェリンの創傷治癒促進効果

高山 喜晴

第11回国際ラクトフェリン会議のご案内

卷頭言

効果的ながん予防物質としてのラクトフェリンを目指して

飯郷 正明

Masaaki Ilgo

名古屋市立大学大学院医学研究科

分子毒物学分野

長年抗がん剤の研究をしてきた私には、ラクトフェリンはがんを抑制する魅力あるタンパク質です。動物実験において抗がん効果を示すためには、かなりの高用量を必要としますが、副作用が殆どないことが大変な魅力です。それもそのはず、出生直後の赤ちゃんが飲む母乳(初乳)には高濃度のラクトフェリンが含まれており、乳児は1日約1.5グラムを毎日摂取している計算になります。従ってこの量は、ラクトフェリンが免疫力の弱い乳児に対し、細菌感染を防御し、健全な成長を促進するための必要量と思われます。

ラクトフェリンは摂取すると胃のペプシンにより加水分解され数多くのペプチドになります。培養細胞にラクトフェリンやそのペプチドを加え培養すると、ある種の細胞からはインターフェロン α やインターロイキン-18などが誘導されます。これらのサイトカインにより免疫細胞は活性化されます。担がんマウスにラクトフェリンを経口投与するとがんの生長は有意に抑制されますし、発がんラットにラクトフェリンを摂取させるとがんの発生が著しく抑制されます。このとき動物の体内にはナチュラルキラー(NK)細胞やT細胞などの免疫細胞の増加が観察され、このことによりがんの発生や生長が抑制されたと考えております。

ラクトフェリン摂取後のヒト大腸組織を各種の抗体で免疫染色を行ったところ、その加水分解産物の抗体で強く染まる細胞があり、ラクトフェリンの一部が細胞内に取り込まれていることが分かりました。さらに、大腸組織にはナチュラルキラー(NK)細胞やT細胞が増えていることも明らかになりました。このことはがん予防には大変重要と思われます。

今後さらに効果的な免疫細胞活性化のために、化学修飾したラクトフェリン又は加水分解産物の中から効果的なペプチドを見いだすための研究が必要です。がん予防物質として安価で効果的なラクトフェリン又は加水分解産物が見いだされることを期待しております。

学会賞受賞研究紹介

反復強制水泳モデルマウスにおける ラクトフェリンの抗うつ効果

岩田 志穂

Shiho Iwata

鳥取大学農学部獣医臨床検査学教室

Lactoferrin (Lf) の抗うつ効果とその作用機序を明らかにする目的で、反復強制水泳試験(以下反復FST)およびリアルタイムPCRを用いた脳の受容体発現解析を行なった。反復FSTによる行動解析の結果、bovine Lf (bLf) の経口投与によって有意な抗うつ作用が得られ、その効果はセロトニン5-HT_{1A}, 5-HT_{2A/2c}受容体阻害剤及びドーパミンD₁, D₂受容体阻害薬の前処置で消失した。リアルタイムPCRによる脳内神経伝達物質受容体発現量の解析の結果、Lfは5-HT_{1A}, D₁およびD₂受容体発現量を増加させる作用があり、特に前頭葉のD₂受容体発現を調節することで、反復FSTによる抑うつ状態を改善する可能性が示唆された。

Lactoferrin (Lf) の抗ストレス作用については、生後10日齢のラットにおける単回Maternal Separationストレスに伴う不安関連行動が、新生子へのbovine Lf (bLf) 投与により軽減されることが報告されている (Takeuchiら、2003)。

一方、抑うつ様行動の評価方法には、Foot Shock (FS)ストレスや拘束ストレス、寒冷ストレス、強制水泳ストレス、テールピンチストレスなどの物理的ストレスがよく用いられ、これらのストレスは動物のホメオスタシスにも影響を与えると考えられている (Pareら、1993)。その中でも、強制水泳試験はPorsoltら (1977) によって開発され、現在、最も汎用されている抑うつ評価法である。マウスあるいはラットに逃避不可能な水槽内において強制水泳を負荷すると、逃避行動の後に無動行動(水面上に顔だけを出し、手足などを動かすことなく浮いている状態)が認められる。なぜ無動状態に陥るかは明確に説明されていないが、心理的絶望または強いストレスに対しての一種の防御反応だと考えられており (Lucki, 1997)、一定時間内(通常5分程度)におけるこの無動行動の持続時間が抑うつ様行動として評価される。臨床上、有効性が認められている既存の抗うつ薬は、本試験により誘

発される無動時間を特異的かつ有意に抑制する。このため、本法は新規抗うつ薬候補物質の前臨床評価や遺伝子改変動物の表現型の解析において幅広く用いられている。また、強制水泳試験を反復して行うと、無動時間の更なる延長が認められ、より慢性的なうつ状態のモデルとして用いることができる (Dal-Zottoら、2000)。また、Kamemoriら (2004) の報告から、Lfが成熟ラットに対しても抗不安作用を有することが明らかになっている。そこで本研究では、慢性的なうつ様行動に対してもbLfが改善効果を発揮するか否かを検証するとともに、その作用機序を明らかにすることを目的とした。

1. 反復FSTによる行動解析

本実験はMezadriら (2011)の報告に準じて実施した。試験はすべて初期に行った。動物を実験環境に順応させるため、少なくとも試験の1時間前にマウス(ICR, 6 weeks, ♂)を実験室に移動した。水槽は水温25°C、水深10cmとし、実験開始1日目 (Pre test)に15分間、2日目 (Test)、7日目 (Retest-1)および14日目 (Retest-2) には各5分間マウスを水槽に入れ、各FSTにおける無動時間を測定した。Fluoxetineを除く薬物は

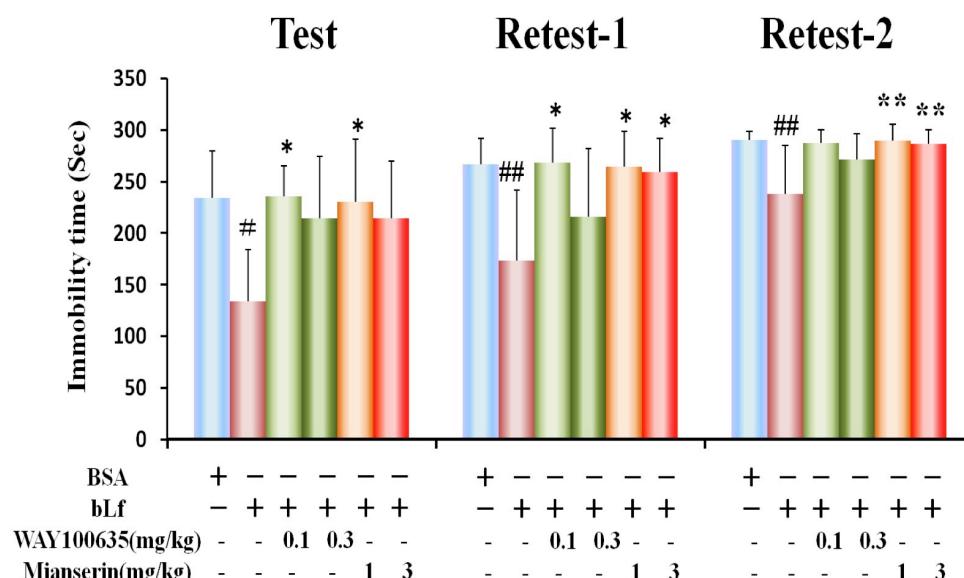


図1 bLf投与による無動時間の短縮に対するセロトニン受容体阻害薬の効果

Mean±SD (n=6-7). #p<0.05 vs.BSA+Saline. ##p<0.01 vs. BSA+Saline.

* p<0.05 vs.Lf+Saline. ** p<0.01 vs. Lf+Saline.

FSTを行う30分前に腹腔内投与した。Fluoxetine投与群においては、実験開始2日目から14日目まで1日1回連続投与した。飼料添加群においては実験初日から15日目までBSAまたはbLfの1%添加飼料を給餌した。

その結果、Saline群ではFSTを3回くり返すことで、無動時間は徐々に延長し、Retest-2ではTestに対して有意な延長を認めた。また、抗うつ薬であるFluoxetineを投与すると、Retest-2における無動時間は有意に短縮した。

反復FSTの期間を通じて1%BSA添加食を給餌した群では、上記のSaline群と同様にFSTをくり返すごとに無動時間は有意に延長した。これに対して、1%bLf添加食を給餌すると無動時間は短縮し、Retest-1およびRetest-2においていずれもbLfによる有意な抗うつ効果が認められた。

bLfによる無動時間の短縮が5-HT受容体を介した作用であるか否かを明らかにするため、5-HT_{1A}および5-HT_{2A/2C}受容体の選択的阻害薬であるWAY100635およびMianserinをFSTの30分前に投与したところ、bLfの効果は両阻害薬によっていずれも消失した(図1)。

同様にbLfによる無動時間の短縮は、ドーパミン(DA)受

容体の影響を受けているか否かを検証するため、D₁およびD₂受容体の選択的阻害薬であるSCH23390およびRacloprideをFSTの30分前に投与したところ、bLfの効果は両阻害薬によっていずれも消失した(図2)。

2. 脳内神経伝達物質受容体発現量の解析

試験開始から15日目の初期に、ペントバルビタールナトリウム麻酔下にてマウスを放血殺し、脳を摘出した。前頭葉、海馬、線条体および縫線核の各部位から脳サンプルを数10 mg採取し、RNA later(Ambion, USA)中に入れて-80°Cで保存した。脳各部位からTotal RNAを抽出し、cDNAの合成を行った後、SYBRGREEN法によるリアルタイムPCRを実施した。脳各部位における5-HT_{1A}、5-HT_{2A}、D₁およびD₂受容体発現量の解析には、ハウスキーピング遺伝子であるGAPDH mRNA発現量に対する相対量を $\Delta\Delta Ct$ 法により算出した。さらに群間の比較は、無処置群の平均値を1とし、各群の平均を相対的に比較検討した。

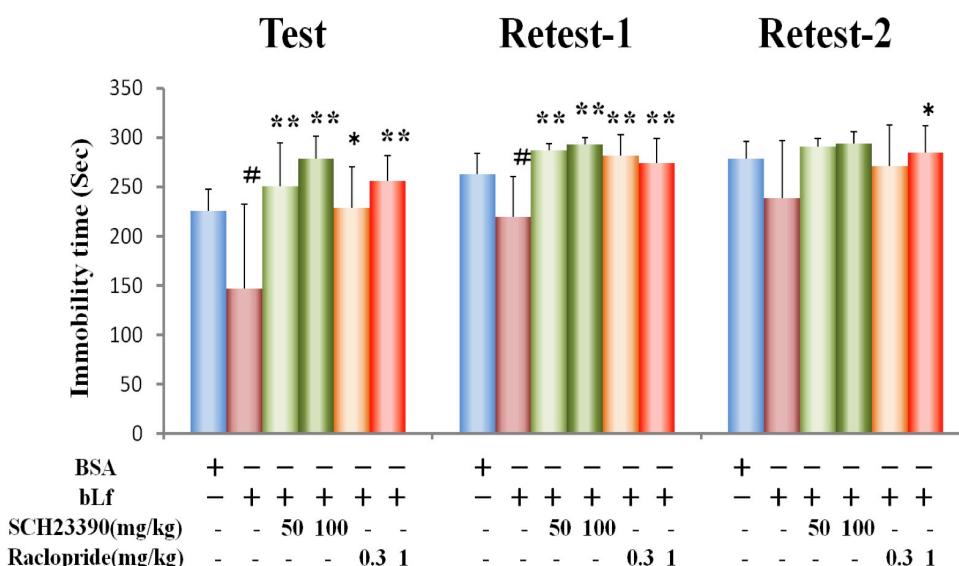


図2 bLF投与による無動時間の短縮に対するドーパミン受容体阻害薬の効果

Mean±SD (n=6-7). #p<0.05 vs.BSA+Saline. ##p<0.01 vs. BSA+Saline.

* p<0.05 vs.Lf+Saline. ** p<0.01 vs. Lf+Saline.

反復FSTを与えた群では、5-HT_{1A}受容体の発現量は前頭葉、海馬および縫線核ではcontrol群に比べて低値を示したが、線条体では逆に増加した。一方、bLf投与群では5-HT_{1A}, D₁およびD₂受容体発現量が増加し、さらにFSTによる前頭葉のD₂受容体の過剰発現を有意に抑制した。よって、Lfは複数の脳領域において5-HT_{1A}, D₁およびD₂受容体発現量を増加させる作用を有し、さらにFSTによる前頭葉のD₂受容体発現を調節することで、反復FSTによる抑うつ状態を改善させる可能性が示唆された。

参考文献

Dal-Zotto S., Marti O. and Armario A. (2000) Influence of single or repeated experience of rats with forced swimming on behavioural and physiological responses to the stressor. Behav. Brain Res., 114:175–181.

Kamemori N., Takeuchi T., Hayashida K. and Harada E. (2004) Suppressive effects of milk-derived lactoferrin on psychological stress in adult rats. Brain Res., 1029(1):34-40.

Lucki I. (1997) The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects antidepressant drugs. Behav. Pharmacol., 8:523-532.

Mezadri.T.J., Batista.G.M., Portes.A.C., Marino-Neto J. and Lino-de-Oliveira.C. (2011) Repeated rat-forced swim test: Reducing the number of animals to evaluate gradual effects of antidepressants. J. Neurosci. Meth., 195:200–205.

Pare W.P. and Clavin G.B. (1993) Animal models of stress in pharmacology. Meth. Behav. Pharmacol., 10:413-441.

Porsolt R.D., Le Pichon M. and Jalfre M. (1977) Depression a new model sensitive to antidepressant treatments. Nature, 266:730–732.

Takeuchi T., Hayashida K., Inagaki H., Kuwahara M., Tsubone H. and Harada E. (2003) Opioid mediated suppressive effect of milk-derived lactoferrin on distress induced by maternal separation in rat pups. Brain Res., 979(1-2):216-224

謝辞

本研究の遂行について、ご指導いただきました鳥取大学農学部の竹内崇先生に感謝申し上げます。

ラクトフェリンの創傷治癒促進効果

高山 喜晴

Yoshiharu TAKAYAMA

(独)農業・食品産業技術総合研究機構
畜産草地研究所

はじめに

ラクトフェリンは抗菌活性や免疫調節能を持つことがよく知られており、生体防御に重要な機能を果たすタンパク質と考えられています。一方、近年の研究により、真皮を構成する線維芽細胞や、表皮を構成する角化細胞に対する新たな機能が発見され、動物実験や臨床試験の結果とも併せて、創傷治癒を促進する因子としての利用が期待されています。この解説文では、現在までに明らかになっている創傷治癒に対するラクトフェリンの機能について紹介します。

創傷治癒の過程

皮膚は物理的なバリアとして生体を外界の侵襲から防御するという重要な役割を担っています。外傷により皮膚が損傷を受けた場合、組織を再建してバリア機能を回復させるため創傷治癒が直ちに開始されます。

創傷治癒の過程は、炎症期(止血と炎症反応)、増殖期(肉芽組織の形成と再上皮化)、成熟期(組織のリモデリング)に大きく分けられます。止血期には血小板凝集反応により血液凝固系が活性化されることで、フィブリン網が創傷部位に形成されます。炎症反応期には、好中球やマクロファージが創傷部位に侵入し、細菌を貪食し傷口の化膿を防ぐと共に、損傷を受けた細胞や細胞外マトリックスの断片を貪食作用により取り除き、以後のプロセスのための「地ならし」をします。増殖期には、マクロファージの放出する線維芽細胞増殖因子(FGF)・腫瘍細胞増殖因子(TGF- β)などの増殖因子により誘引された線維芽細胞が創傷部位に侵入し、真皮の主要な細胞外マトリックス成分であるI型コラーゲンを産生して、フィブリンを置き換え、仮設の組織である肉芽組織を形成します(図1)。肉芽組織の特徴は、線維芽細胞に栄養を供給するための血管新生が活発に行われることです。この肉芽組織を創傷部位周辺から遊走してきた角化細胞

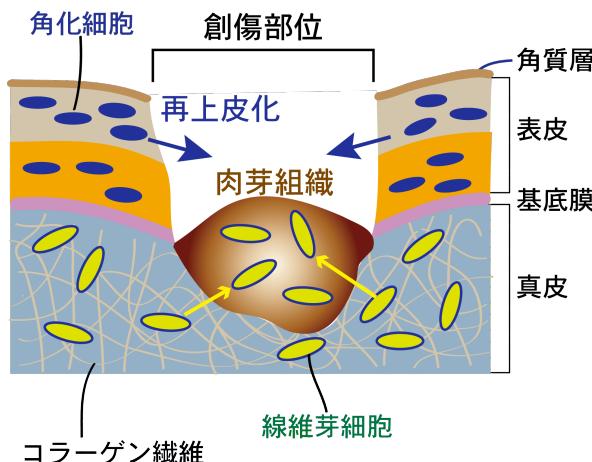
(ケラチノサイト)が覆うことで、再上皮化がおこなわれ、表皮が再生されます(図1)。成熟期には、肉芽組織のコラーゲンマトリックスの再構成が行われ、過剰に産生されたコラーゲンが分解されて、再生された組織が安定化されます。

動物実験・臨床試験による検証

Streptozocin投与により糖尿病を誘発したICRマウスの背部の皮膚に人工的に開放創を作った創傷モデルにおいて、ラクトフェリンの局部投与により、創傷部位の面積の縮小が促進されます(1)。また、組み換えヒトラクトフェリン(talactoferrin)を、正常ICRマウスおよび遺伝性糖尿病モデルマウス(レプチン受容体変異マウス)に局所投与することで、同様に創傷面積の縮小が促進されたとの報告があります(2)。さらに、ヒト臨床試験でも、ラクトフェリンの局部投与により、糖尿病性の足部潰瘍の縮小が認められたと報告されています(3)。

炎症反応に対するラクトフェリンの機能

増殖期に先立つ炎症反応は創傷治癒に必要な過程です。これは、炎症性サイトカインの一種であるIL-6を欠

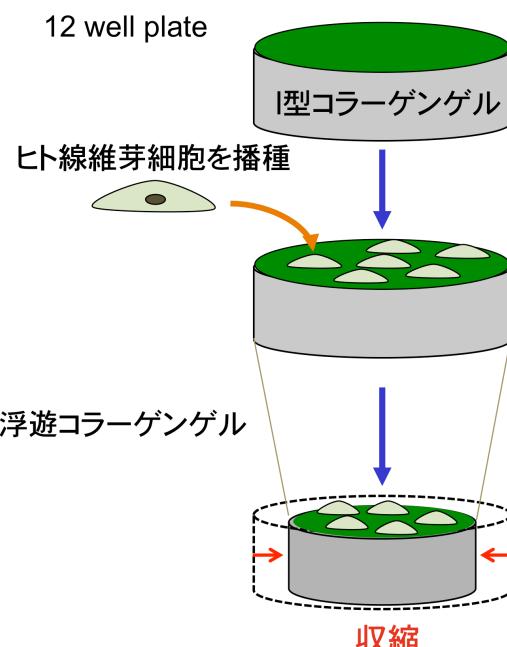
**図1 創傷治癒の概要**

真皮を構成する線維芽細胞は、創傷部位へ移動し、コラーゲンを産生して肉芽組織を形成する。その上を角化細胞が移動し、被覆することで再上皮化が行われる。

損したマウスでは、創傷部位への好中球やマクロファージの侵入が遅れ、創傷治癒により時間を要することから裏付けられます。

マウスの創傷部位に組み替えヒトラクトフェリンを局所投与した研究において、IL-6、IL-8、腫瘍壊死因子(TNF- α)など、炎症性サイトカインの発現が上昇することが報告されています(2)。また、組み換えヒトラクトフェリンはヒト株化T細胞であるJurkat-T細胞や、ヒト単球系細胞であるTHP-1の遊走を促進することも報告されています(2)。これらの知見は、ラクトフェリンが炎症性サイトカインの発現を誘導して、創傷治癒の初期の過程を促している可能性を示しています。

このように、炎症反応は創傷治癒に必須の過程ですが、創傷治癒の後期に至るまで炎症反応が持続することは、逆に完治を妨げます。ラクトフェリンの免疫系に対する機能は、活性化と抑制の両面の機能を示すことが知られています。皮膚の場合、IL-1 β によって誘導されるランゲルハンス細胞(皮膚特異的な抗原提示細胞)のリンパ節への遊走が、ラクトフェリン投与により抑制され、炎症性サイトカインの産生が抑制されるとの報告があり

**図2 線維芽細胞によるコラーゲンゲルの収縮**

ます(4)。このように、創傷治癒の各段階で、ラクトフェリンが免疫機能をどのように調節しているか、今後の研究の進展が期待されます。

線維芽細胞に対する機能

線維芽細胞は創傷治癒の増殖期において肉芽組織を収縮させることで、創傷の表面積を減少させ、創傷の治癒を促進することが知られています。創収縮が阻害されると傷口の閉塞が遅れます。収縮が過剰になるとケロイドを引き起こし瘢痕が残るため、創収縮を適切にコントロールすることは創傷治癒に重要とされています。この創収縮の過程は、培養系で簡単に再現することが可能であり、線維芽細胞をI型コラーゲンゲル上に播種したあとゲルを培養皿から剥離すると、培養時間の経過に伴いコラーゲンゲルの面積が収縮する現象が知られています(図2)。ラクトフェリンは血小板由来細胞増殖因子(PDGF)・FGF・TGF- β などと同様に、線維芽細胞によるコラーゲンゲルの収縮を促進する機能を持ちます(図3)(5, 6)。

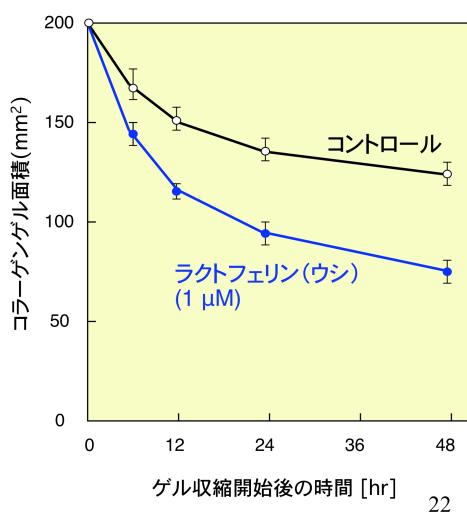


図3 ラクトフェリンによる線維芽細胞の、コラーゲンゲル収縮活性の促進
(参考文献5より改変して引用)

単層培養した線維芽細胞を部分的に剥離した創傷モデルや、チャンバーを用いた細胞遊走モデルにおいて、ラクトフェリンは線維芽細胞の遊走を促進することが報告されています（5, 7）。また、ラクトフェリンは、真皮の細胞外マトリックスの主要な成分であるI型コラーゲン、ヒアルロン酸、 α エラスチンの産生を促進します（8, 9）。これら結果は、創傷治癒の過程において、ラクトフェリンが線維芽細胞の創傷部位への遊走と肉芽組織における細胞外マトリックス成分の形成を促進する可能性を示しています。また、ラクトフェリンは、ヒト皮膚線維芽細胞において、IL-6、IL-8、MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein-1) の発現を誘導することから、これらのサイトカインの産生を制御して、間接的に創傷の治癒を促進している可能性が考えられます。

角化細胞に対する機能

角化細胞は表皮を構成する細胞であり、表皮が損傷を受けた場合、基底層の角化細胞が増殖すると共に創傷部位に遊走し、傷口の表面を覆うことで表皮の再建が行われます。単層培養したヒト表皮角化細胞を部分的に剥離させる *in vitro* 創傷モデルを用いた研究によると、ラクトフェリンは角化細胞の欠失部位への遊走を促進する機能が認められます（1, 10）。表皮を構成する角化細胞

と類似した性質を持つ角膜上皮細胞を水酸化ナトリウムで処理する角膜損傷モデルにおいても、ラクトフェリンは、傷の閉塞を促進することが報告されています（11）。ヒト角化細胞において、ラクトフェリンはゼラチンを分解するマトリックスメタロプロテアーゼ9 (MMP-9) の発現を促進する事が報告されており、組織のリモデリングへの関与が示唆されます（1）。

おわりに

細菌感染やバイオフィルムの形成は創傷の治癒を妨げます。また、褥瘡は糖尿病の重大な合併症の一つあり、糖尿病の患者では創傷の治癒が遅れ、感染症のリスクが増すことは良く知られています。これまでに紹介した、ラクトフェリンの免疫調節能力や線維芽細胞・角化細胞に対する機能とは別に、ラクトフェリンの抗菌活性・バイオフィルム形成抑制活性・抗肥満・脂質代謝改善効果が創傷治癒に対して相乗効果を発揮している可能性が考えられます。

参考文献

- 輪千浩史「ラクトフェリン2009」（日本医学館、東京）pp46-54 (2009).
- Engelmayer J. et al., *J. Surg. Res.* **149**, 278-286 (2008).
- Lyons TE. et al., *Am. J. Surg.* **193**, 49-54 (2007).
- Cumberbatch E. et al., *Immunology* **100**, 21-28 (2000).
- Takayama Y. and Mizumachi K. *FEBS Lett.* **508**, 111-116 (2001).
- Takayama Y. et al., *J. Biol. Chem.* **278**, 22112-22118 (2003).
- Tang L. et al., *Wound Repair Regen.* **18**, 123-131 (2010).
- Saito S. et al., *Biotechnol. Lett.* **33**, 33-39 (2011).
- Ishii N. et al., *Biochem. Cell Biol.* **90**, 504-512 (2012).
- Tang L. et al., *Br. J. Dermatol.* **163**, 38-47 (2010).
- Pattamatta U. et al., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **50**, 1636-1643 (2009).

第11回 国際ラクトフェリン会議のご案内

第11回国際ラクトフェリン会議は、2013年10月6日から10日まで、イタリア・ローマのホテル・コロンバスで開催されます。この会議は1992年にホノルル(ハワイ)で第1回が開催されて以来、ほぼ隔年に開催されています。医学・歯学・薬学・農学など幅広い分野のラクトフェリン研究者が集まり、基礎から食品・医療分野への応用まで幅広い範囲をカバーする会議です。今回は、ラクトフェリンの構造と遺伝子発現、受容体と局在、免疫調節機能、細胞増殖と分化に対する機能、抗菌活性と寄生虫への効果、肥満に対する効果、バイオマーカーとしての利用、母乳と粉乳中のラクトフェリン、新生児の感染症とラクトフェリン、組み換えラクトフェリン、ラクトフェリンの臨床応用、ラクトフェリンの新規利用の各セッションが予定されています。演題申し込みと早期参加登録の締切は7月1日です。この会議のプロシーディングは、Biometal誌に掲載される予定です。

前回の国際会議に引き続いで、35歳以下の大学院生・ポスドクの優れた口頭発表を対象として「The Genevieve Spik Award」が授与されます。副賞として、滞在費(500ユーロ)、参加登録費、Gala dinner参加費に相当する賞金が授与されます。国際ラクトフェリン会議にSpik賞が設けられた経緯については、国際会議の組織委員でもある本会の島崎副理事長がニュースレター4号で紹介しています。また、前回のマサトラン(メキシコ)での第10回国際会議の模様については、桑田英文氏(NRLファーマ)から、ニュースレター3号に参加報告が寄稿されています。会議全体の雰囲気や演題の傾向・トピックスがわかりやすく纏められていますので、是非お読みください。

第11回国際会議においても、会員の皆様の積極的なご参加・発表をお願いします。

大会ホームページ <http://www.lactoferrinconference.com>

会場 ホテルコロンバス <http://www.hotelcolumbus.net/>

日本ラクトフェリン 学会ニュースレター

第8号 (2013年6月発行)

ニュースレター編集
日本ラクトフェリン学会
広報委員会

高山 喜晴

農業・食品産業技術総合研究
機構 畜産草地研究所

吉江 弘正

新潟大学大学院 医歯学総合
研究科 教授

島崎 敬一

北海道大学名誉教授

日本ラクトフェリン学会
事務局

〒232-0024

横浜市南区浦舟町4-57

横浜市立大学附属

市民総合医療センター

臨床研究推進センター

田中 克明

TEL: 045-261-5656

内線1871

FAX: 045-253-9902

E-mail:

lacto@yokohama-cu.ac.jp