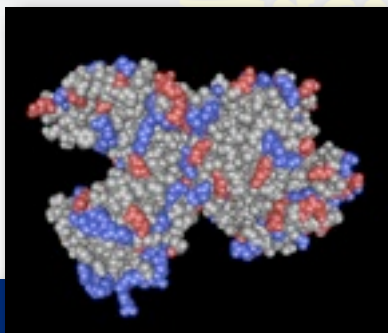


Lactoferrin NEWS

日本ラクトフェリン学会ニュースレター 第11号

2014年5月



1 巻頭言

- 第6回学術集会の開催にあたって 高山 喜晴

2 トピックス

- 口内炎に対するラクトフェリン投与の効果 小林幸隆

3 富田賞受賞研究報告

- 放射線誘発の胸腺リンパ腫に対するラクトフェリンの有用性に関する検討 小久保 年章

4

- タンパク質立体構造ビューワーCMolを用いたiPadでのラクトフェリンの構造表示 島崎 敬一

iFIA2014日本ラクトフェリン学会セミナーのお知らせ

巻頭言

第6回学術集会の開催にあたって

高山 喜晴

Yoshiharu TAKAYAMA

第6回学術集会実行委員長

農研機構 畜産草地研究所

この度、本学会の第6回学術集会を、2014年の11月8日(土)に、茨城県つくば市のエポカルつくば(つくば国際会議場)で開催させていただくことになりました。皆様ご存じのようにラクトフェリンは多機能タンパク質であり、「鉄結合性の生体防御タンパク質」という古典的な概念を打ち破る多彩な機能が発見されています。このようなタンパク質の機能解明と有効利用を図るためには、医学・歯学・農学・工学という既存の分野の枠を超えた取り組みが必要で、本学術集会も2004年に第1回ラクトフェリンフォーラムが開催されてから6回目の開催となります。今回は、「ラクトフェリンの医薬品としての利用を探る」をテーマに、試験研究に用いるラクトフェリンの品質の標準化と、ラクトフェリンの修飾による機能強化をメインとしたシンポジウムを計画しています。また、特別講演では、テキサス大学サウスウェスタンメディカルセンターのJoachim Herz教授をお招きしてラクトフェリン受容体の一つとして知られているLDL受容体関連タンパク質(LRP)についてご講演していただきます。いずれも、幅広いラクトフェリン研究者の方々に興味を持って頂けると存じます。

今回の学術集会の開催地となるつくば市は、2005年につくばエクスプレスが開業して以来、東京方面からのアクセスの利便性が向上し、沿線の開発が進行中ですが、研究学園都市らしい施設や建物の傍らに古くからの茨城の田園風景が展開しているのが特徴です。古いものと新しいものが混在したつくばの地で、様々な機能が混在するラクトフェリンというタンパク質について語り、交流を深めていただきたいと思います。

口内炎に対するラクトフェリン投与の効果

小林 幸隆

Yukitaka KOBAYASHI

ごばやし歯科医院

口内炎は、痛く不快なものです。口内炎とはどういうものなのか、そしてラクトフェリンをどのように用いれば効果的で、どのように作用するかを、歯科医の経験から説明いたします。

口内炎は、口の中の粘膜に出来る直径1センチ以下の類円形の白い潰瘍のことをいいます(図1)。単独で出来る場合も複数出来る場合もあります。食事中に食べ物や歯が当たると、強い痛みが生じます。誰もが不愉快な思いをしたことがあると思います。

口内炎は、病気の名前ではありません。症状の名前です。様々な病気で口内炎が発生します。ペーチェット病や帯状疱疹などで多く現れます。身近な例として手足口病や麻疹などが上げられます。悪性腫瘍の放射線治療などの副作用として出現することが多いです。

病気の症状以外に出現する口内炎をアフタ性口内炎といいます。日常的にできる口内炎は、このアフタ性口内炎を指します。ちなみにアフタ【aphtha】というのは、本来は潰瘍形成を意味する言葉でしたが、現在では口内炎を意味する言葉になっています。それなので

アフタ性口内炎を直訳すると口内炎性口内炎という意味になってしまいますが、上記のような病気の症状以外の口内炎の総称という意味に解釈すべきだと思います。

アフタ性口内炎の原因メカニズムは、諸説あります。これといった定説はありません。粘膜はナイーブな組織です。そして口腔内は外部に開かれているため、原因は数多く考えられます。具体的には、以下の点が上げられます。

- 全身的な原因
 - ・鉄分やビタミンBなどの栄養不足
 - ・疲労や免疫力の低下
- 口腔内の原因
 - ・食事中的物理的的刺激(熱いもの、魚の骨など)
 - ・歯軋りなどの不正な顎の動き
 - ・口腔内衛生環境の悪化



図1 アフタ性口内炎



図2 ラクトフェリンD(左)とラクパッチ(右)

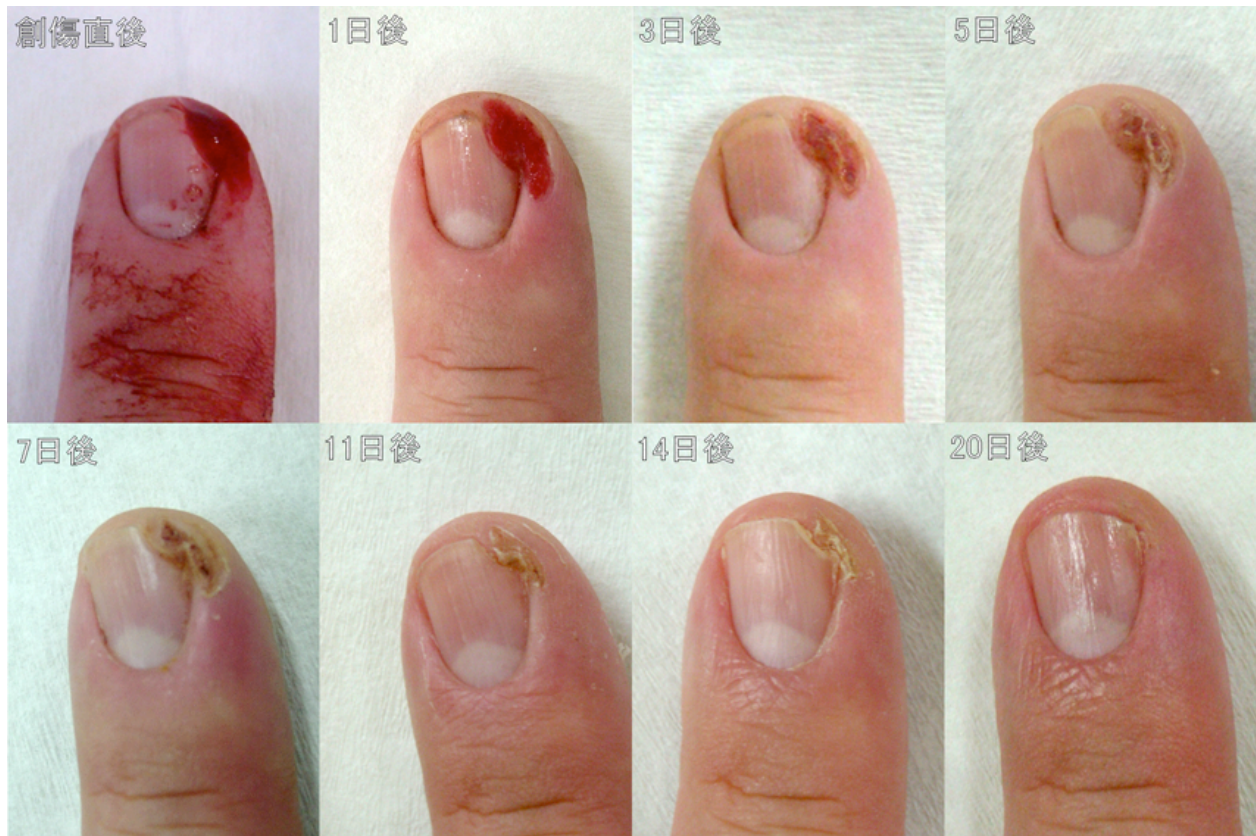


図3 指の創傷にラクトフェリン軟膏を塗布した後の治癒までの経緯

歯科医として口内炎の患者さんを多数診てまいりました。その点から言わせてもらうと、口内炎の最大の原因は、自分の歯です。食事時の咀嚼や歯軋りによって、気づかぬうちに粘膜を噛んでしまい、それが口内炎となるものが多いようです。勿論通常の食事でも粘膜を噛むことは多いのですが、栄養が行き届いていて、疲労していなければ、噛んだとしても口内炎までならないということになります。なにより疲労していると様々な事故や怪我が多くなります。顎の動きもその例外ではないというわけです。噛む回数が増えれば、それだけ口内炎の発生率も上がるわけです。口内炎は客観的な記録を取る事がほぼ不可能なので、診療の上での感想の粋を逃れませんが。

治療法としては、全身的要因としては鉄分やビタミンなどのサプリメントの摂取が一般的です。鉄分やビタミンBが欠乏すると、口腔粘膜が荒れることが分かっています。というより悪性貧血の症状として起きます。悪性貧血までいかななくても全身の免疫力が低下すると口内炎が多発する場合があります。口内炎にビタミンBや鉄

分のサプリメントが効くというのは、このことに由来します。口腔内の治療法としては、軟膏の処方が主流です。消毒薬、ステロイド、抗生物質などの軟膏を処方することが多いです。

私が属する臨床ラクトフェリン研究会では、ラクトフェリンを口内炎の治療にも用いています。全身用と口腔内用の2種類のラクトフェリンを用いています。全身用のラクトフェリンDと口腔内用のラクパッチです(図2)。臨床ラクトフェリン研究会々員は会員価格で購入できます。また、NRLファーマより販売されております。

ラクトフェリンを服用すると、疲労回復、免疫向上などの効果があります。つまりラクトフェリンは免疫力などの低下した全身機能を回復させることで、治癒を促進させるのです。実際、悪性腫瘍の放射線治療の副作用などで免疫力が低下し、口内炎が多発した方が、ラクトフェリンを服用し、口内炎が治る、苦痛が和らぐなどの報告があがっています。

これに対しラクパッチは、粘膜に直接塗布します。ラクパッチは糖衣錠になっており、貼薬すると粘膜に張り

付きます。これによって口内炎を被覆し、刺激から遮断すると同時に、ラクトフェリンにより治癒の促進を図るのです。当院では、より利便性を高める為に、軟膏に加工して用いています。

ラクトフェリンを口腔内に用いての評価ですが、従来の口内炎用軟膏よりも短期間で治癒します。あまりにも早く治癒するので、写真撮影が困難なほどです。これは湿潤療法の治癒機転から説明できます。創傷の治療は、従来は創面に強い消毒薬を用い、乾燥させる方がよいと考えられていました。主に感染防止を図ったのですが、強い消毒薬は健全な組織を座滅させ、乾燥は治癒機転を阻害するため、治癒が遅延すると考えられています。ならば何も入っていないワセリンなどで創面を被覆し湿潤状態を保つ方が、治癒が早いというわけです。

『なにも足さない。なにも引かない。』というお酒のCMが昔ありました。湿潤療法は治癒機転の邪魔をしないことで、治癒を促進するという理屈になるわけです。

これに対し、ラクトフェリンは治癒を促進します。健全な組織にはダメージを与えません。つまりラクトフェリンを軟膏などで投与した場合、治癒を促進する『なにかを足す』分だけ湿潤療法よりも効果が高いという理屈になります。実際に、私の指に出来た創傷にラクトフェリン軟膏を塗布した画像を示します(図3)。通常よりも3倍ぐらい治癒が早くなるのを感じました。

ラクトフェリンが普及すれば、口内炎をはじめ、様々な方の福音になると思います。

より多くの方に使われることを願っております。

放射線誘発の胸腺リンパ腫に対するラクトフェリンの有用性に関する検討

小久保 年章

Toshiaki KOKUBO

独立行政法人放射線医学総合研究所
研究基盤センター

放射線が誘発するがんに対してラクトフェリン(LF)が防護効果を示すか否かを明らかにするため、放射線分割照射によって誘発される胸腺リンパ腫の発生がLFの経口投与により抑制されるか検討した。本実験条件下におけるLFの胸腺リンパ腫の発生抑制効果はマイルドなものであった。

放射線に対する防護剤の報告は多くあり、特に被ばく前の投与で効果が認められている。LFについても放射線防護作用の可能性が検討されており、C3H/Heマウスを用いて0.1%LF飼料で1ヶ月間飼育し、その後6.8GyのX線を全身照射して30日間の生存率をみた研究が行われている¹⁾。この検討により、対照群での生存率が61.5%に対してLF処置群で84.6%と高い生存率

が認められ、LFに放射線防護作用を有することが示唆された。この報告は放射線の急性障害に対するLFの効果についてみているが、放射線被ばくの影響として重要なものに発がんリスクがある。本研究では、放射線が誘発するがんに対してLFが防護効果を示すか否かをみるために、放射線分割照射によって誘発される胸腺リンパ腫の発生抑制効果を指標に実験を行った。

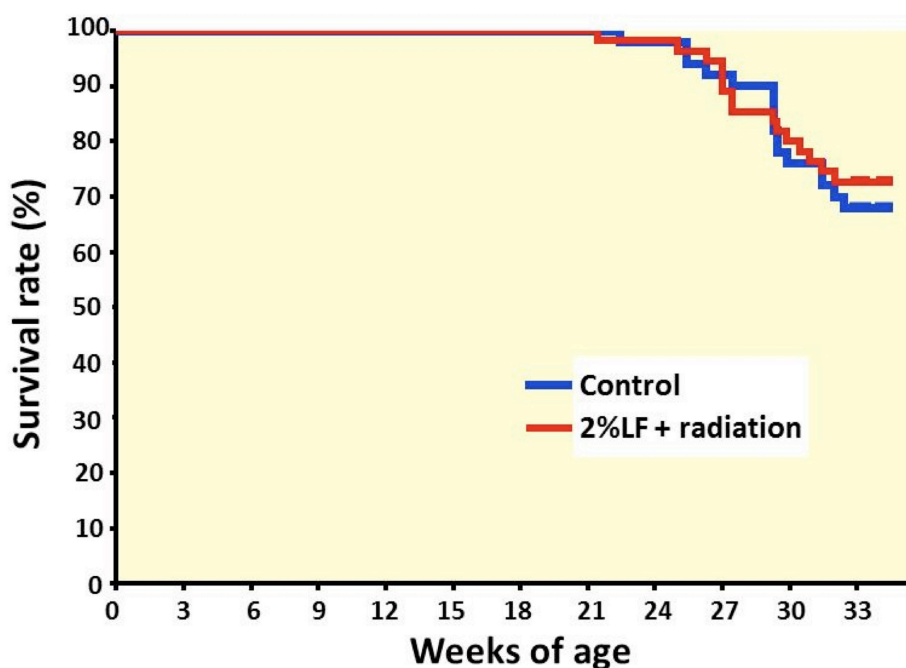


図1 Kaplan-Meier法による生存率曲線

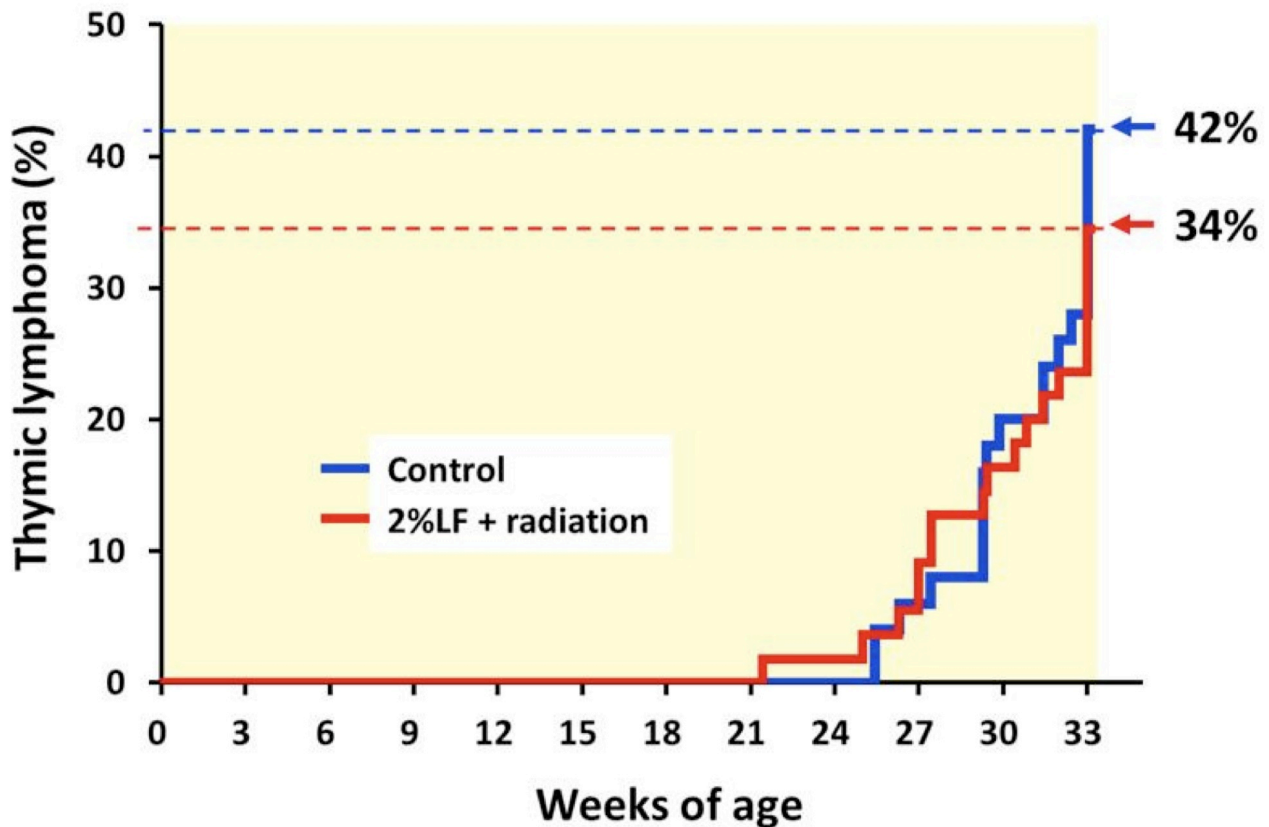


図2 胸腺リンパ腫の発生曲線

胸腺リンパ腫は、胸腺が原発となるT細胞性リンパ腫であり、放射線照射により誘発されやすい腫瘍の一つとして1950年代頃より研究が進められている。生後約5週齢のマウスに1.6GyのX線を全身照射し、照射1週後に同様にX線を全身照射することを4回繰り返すことで、最終照射から3~10ヶ月後に比較的高率に胸腺リンパ腫の発生が認められる。

今回の実験では4週齢の雌のB6C3F1マウスを用いてLF0%ないしLF2%飼料にて2週間通常飼育を行い、6週齢より週1回、X線1.4Gyの全身照射を4回行った。そして33週齢でマウスの剖検を行った。

マウスの生存率は図1の生存率曲線に示すように、LF処置の有無に関係なく同様の生存推移がみられた。胸腺リンパ腫の発生率は、LF非処置群で42%に対して、LF処置群で34%と統計学的な有意差はみられなかったが、LF処置により胸腺リンパ腫発生の抑制傾向が認められた(図2)。

また放射線分割照射後のNK細胞への影響をみる

ために以下の実験を行った。3週齢の雌のB6C3F1マウスを用いて、LF0%ないしLF2%飼料にて飼育を行い、6週齢よりこれらマウスに対して週1回の頻度で、X線1.4Gyの全身照射を4回行った。最終照射から24時間後(9週齢)、1週間後(10週齢)及び3週間後(12週齢)にマウスを安楽死して、脾臓を摘出し脾臓中のNK細胞の比率を求めた。その結果NK細胞の比率は、放射線照射したマウスは放射線非照射マウスに比べて低値を示したが、放射線照射した群同士で比較すると、LF処置群がLF非処置群に比してNK細胞の比率の高値が認められた(図3)。

LFにはヒドロキシラジカルに対するラジカルスカベンジャーの可能性が示唆されており²⁾、放射線防護のメカニズムの一つと考えられる。またLFにはNK細胞を活性化させる能力が知られており、今回の実験でも放射線傷害後のNK細胞数の回復がLF処置群で有意にみられており、LFに免疫系を増強させることが示唆される。またLF処置による胸腺リンパ腫の発生抑制効果は統計学的

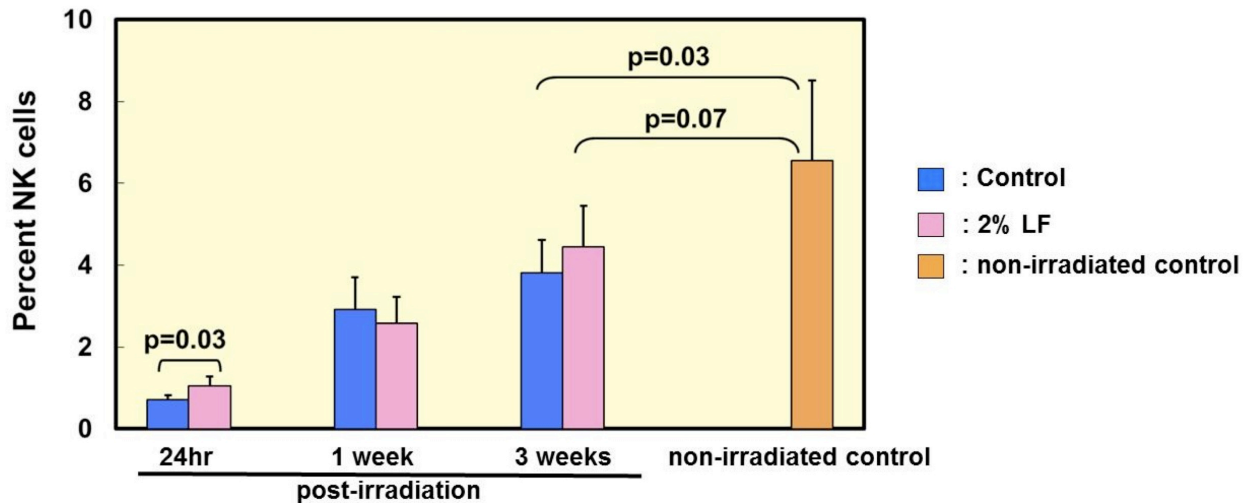


図3 X線4回照射後の脾臓中のNK細胞の比率

に有意ではなかったが、腫瘍発生の抑制傾向が認められた。放射線照射により胸腺のリンパ球傷害がLFの放射線防護作用を上回っていたことが、抗腫瘍効果がマイルドであった可能性がある。本研究で照射した線量より低線量で、短期間で腫瘍を誘発する適当な動物モデルはほとんどないために、LF単独処置による放射線誘発腫瘍の抑制効果を確認することは難しいかもしれない。今後はLF単独ではなく、放射線防護作用や抗腫瘍効果のある他の薬剤や食品等との併用効果の検討を加えることで、LFの保有する機能を有効に活かせる検証が必要であると考え。

参考文献

1. Nishimura Y. et al., J Radiat Res 55, 277-282 (2014).
2. 飯郷正明「ラクトフェリン2009」(日本医学館、東京)pp32-37(2009).

タンパク質分子立体構造ビューワーCMolを使ったiPadでのラクトフェリンの構造表示

島崎 敬一

Keiichi SHIMAZAKI

北海道大学 名誉教授

はじめに

ラクトフェリンがどのように機能するかを解明するためには、分子構造の詳細を検討することが必要になります。タンパク質の立体構造を表示するソフトウェアはさまざま出回っており、フリーソフトでも高度な軌道計算などを要求しなければ十分な実用レベルにあります。パソコンアプリ以外にもiPadなどのタブレットで作動するものも幾つも入手できます。デスクトップ版と連携して高度な表現を行うアプリから、ビューワーとしてタブレットだけでの操作を行うアプリまで多様です。iPad用のアプリとしてMolecules、CMol、PyMOL、iProtein、iMolview、Ball & Stick、CueMol、RCSB PDBその他がありますが、それらの中からフリーで使えるCMolでラクトフェリン分子の立体構造を表示してみました。その結果、鉄イオンが炭酸イオンと近傍のアミノ酸残基と配位結合している状態がよく観察でき、また、C-ローブにある糖鎖が分子表面の一部を覆っていることが表現できました。

CMolの操作法

- 以下にiPadにおけるCMolの操作手順を、CMolのウェブサイトにあるマニュアルを参考にして簡単に記します。
- iPadを横長の画面にしてCMolを開き"Options"ウインドウの"Search pdb.org"をタップし"lactoferrin"で検索します。表示したいPDFデータをタップして選択し、さらに"Download"をタップします。なお、"lactoferrin"というキーワード検索でヒットするデータは非常に多いため、予めRCSB Protein Data Bankのサイトで検索を行い、用いるデータのPDB IDで"Download"することを推奨します。ここではウシラクトフェリン"1BLF"をダウンロードしました。
- データベースからのダウンロードが終了したら"Options"メニューに戻り"Load PDB"をタップします。
- "1BLF"を選択し、読み込みが終わってから"Options"メニューに戻って"Selections"をタップします。

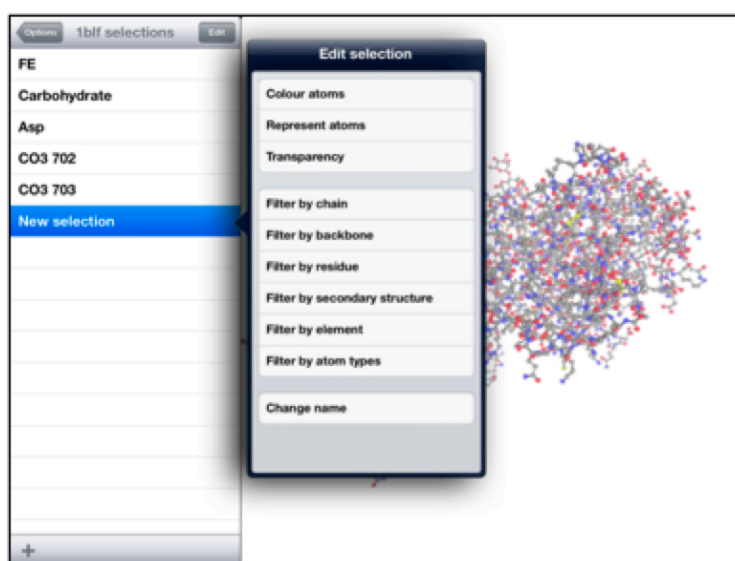


図1. CMolを立ち上げて1BLFをロードし、Selection ウィンドウを開いた画面。

- まず左下隅のプラス(+)マークをタップすると"New selection"という項目が出来るのでこれをタップし、新たに開いたサブウィンドウ"Edit selection"メニュー(1blf selectionsという名称)の最下行"Change name" で、たとえば"All"と入力します。
- "Edit selection"メニューに戻って"Represent atoms"をタップし、"Ribbons"と"Cartoon"をタップします。すると画面の分子はBall and stick、Ribbons、Cartoonで表示され、Ball and stickのチェックを外すとBall and stick の表示は隠れます。
- 鉄イオンを表示するには以下のようにしました。
 - ボックスの外側をタップしてポップバーを隠し、再度プラス(+)アイコンをタップして"New selection"を作り、今度は"FE"と入力しました。
 - "Edit selection"メニューの"Filter by residue"をタップし、search boxに"FE"と入力するとA FE 700とA FE 701の2つが表示されるので、それぞれをタップあるいは"Invert" ボタンをタップしてチェックマークを付けます。"Filter by element"でも同じ操作が行えるようです。
 - "Edit selection"メニューに戻り、"Represent atoms"を選択して"Spheres"をタップすると鉄イオンが球で表示されます。さらに色を変えるには"Color atoms"で行います。
- 鉄イオンに結合しているCO₃イオンを見るために"CO₃" の"Selections"を作り、"Filter by residue"の検索欄にCOと入力すると"A CO3 702"と"A CO3 703"が表示されるので両方を選択し、オレンジ色のSphereで表現してみました。
- 鉄イオンをズームアップして、鉄イオンと相互作用しているアミノ酸残基をタップすると、選択された残基名(たとえばA TYR 92)と"turn it into a selection"という項目が表示されます。これをタップすると "A TYR 92"という名称の"Selection"項目が出来ますが、ラクトフェリン分子の場合は構造が複雑で鉄イオンに配位している残基を正しくタップできなかつたので、既知のデータを活用することとしました。
- N-ローブではAsp60、Tyr92、Tyr192、His253が関連アミノ酸残基なので、"Filter by residue"で該当残基にチェックを入れ、これまでに述べたのと同様にして表示方法と色調を設定しました。
- ラクトフェリン分子には糖鎖があり、これを表示するために新規の"Selection"を作成し"carbohydrate"としました。"Filter by residue"では結合水を含む全ての構成残基が表示され、糖残基は"NAG 690"から"MAN 699"にあります。該当する残基を選択した後に"Represent atoms"でたとえば"Spheres"とすると、C-ローブの表面を糖鎖が蔽っている状態が表示できました。
- 分子モデル画面に戻り、全体を確かめた後に縦長画面にするとメニュー画面が隠れるので、on/offボタンを押しながら"home button"を押してスクリーンショットを保存できます。写真アルバムに保存された画像をメールで送信してみたところ、PNGファイルとして受信できました。
- さらに、メニュー"Appearances"で分子の表示条件の保存、読み出しができます。左下隅のプラス(+)をタップすると"New appearance"が出来て現在の条件が保存されるので、右の青マークをタップして名称を入力します。後日、同じ分子のPDFデータを読み込んだ場合、"Appearances"メニューの該当項目をタップすると、保存した時の状態が再現されます。

その他のメニューでの操作と機能

- "Slabbing"では"Near clipping"と"Far clipping"があり、見える範囲(深度)が調節できます。

- "Settings"メニューには、"Background color", "Scalling", "Camera", "Initial rendering"の4項目があり、以下の操作が可能です。
 - "Scalling"で原子の表示サイズを変更できます。
 - "Camera"の項目ではFoV (field of view, i.e. aperture)で分子の拡大・縮小を、Fogで全体の色調の濃淡を変更できます。また、Inertiaを右側にスライドさせると、分子をズーム、回転、移動させた際に停止するまでの時間が長くなります。
 - "Initial rendering"に表示されている様式で新規に読み込んだ分子モデルが表示されます。"Ball and stick", "Spheres", "Ribbons", "Sticks only", "Cartoon"から選べます。
- 作成した描画分子の用途によっては背景色の変更が必要になります。"Options"メニューの"Settings"で"Background color"を変更します。
- 分子の構成要素の色を個別に変更するには、"Options"メニューの"Selections"で作成した要素を選択し、"Color atoms"で"By element" "By chain", "By secondary structure", "By B factor"その他さまざまな色調が選択できます。なおB-factorは温度因子でゆらぎの度合を色調で表し、温度が高いほどゆらぎが大きいことを意味します。
- "Filter by residue"でN-ローブとC-ローブをそれぞれ別の表現方法にしようとしたのですが、残基を範囲指定する方法が分からず諦めました。

CMol (<http://www.cmol.org.uk>)

RCSB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)

附記

- この記事の操作はiPad (iOS Ver.7.1.1)を用いて行いました。CMolはiOS 3.2以降対応となっており、iPhone版もあります。一つ気になるのは、最後のアップデート(バージョン1.3.3)が2011年4月で、最近の記録がないことです。
- ニュースレター第7号(2013年2月)で、ホームページに回転する分子モデルを表示する方法を述べました。その際にはパソコンで作動するフリーソフト、VMDを用いましたが、このソフトウェアは回転させた分子を連続的にbmpファイルに取り込む機能を持っていることが分かりましたので、この欄を借りて訂正させていただきます。

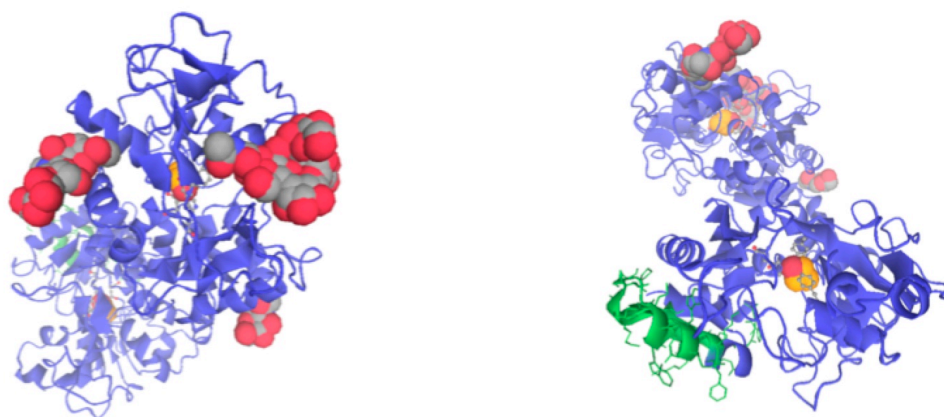


図2.ラクトフェリン主鎖をribbonとcartoonで、鉄イオン、炭酸イオン、糖鎖をsphereで示した。またラクトフェリン部分を緑色で、鉄イオンと配位しているアミノ酸残基をball and stickで表した。N-ローブのラクトフェリンとC-ローブに結合している糖鎖を分かりやすく示すために2つの図とした。

日本ラクトフェリン学会 セミナー開催のご案内

2014年5月21日(水)から23日(金)まで、東京ビッグサイトで、第19回国際食品素材/添加物展・会議 (ifia JAPAN 2014・主催:日本食品化学新聞社)が開催されます。本学会では、昨年に引き続き、「日本ラクトフェリン学会セミナー」を開催し、ラクトフェリン研究の基礎から最新の知見までご紹介します。会員の皆様には奮ってご参加いただき、活発なご意見や討論をお願いいたします。

日時:5月21日(水)13:30~16:30

場所:東京ビッグサイト 会議棟 701/702会議室

- 津田洋幸先生(名古屋市立大学津田特任研究室)
セミナー開催のあいさつ
- 平橋淳一先生(慶應義塾大学医学部)
ラクトフェリン—好中球細胞外トラップ(NETs)抑制薬—:炎症性および血栓性疾患に対する新たな治療薬としての可能性
- 小久保年章先生((独)放射線医学総合研究所)
放射線誘発腫瘍に対するラクトフェリンの有用性
- 大槻克文先生(昭和大学江東豊洲病院)
早産ハイリスク症例に対する腔内環境改善を目指したラクトフェリン(LF)による早産予防の試み
- 森下聡氏(ライオン(株)生命科学研究所)
ラクトフェリンの脂肪細胞に対する脂肪分解促進効果について
- 中野学氏(森永乳業(株)食品基盤研究所)
ラクトフェリン+ラクトパーオキシダーゼの口腔衛生改善効果

なお、セミナーの詳細については、下記のリンクをご覧ください。
<http://www.ifiajapan.com/2014/jp/visitor/seminar.html>

日本ラクトフェリン 学会ニュースレター 第11号 (2014年5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