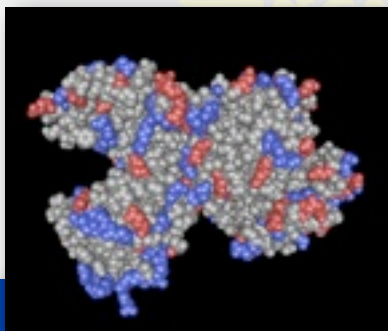


# Lactoferrin NEWS

日本ラクトフェリン学会ニュースレター 第13号

2015年2月



## 1 巻頭言

## 「Serendipity」

高田 隆

## 2. 学術集会開催報告

## 第6回学術集会を振り返って

高山 喜晴

## 3. 学会賞受賞研究紹介

## IgG Fc融合技術を応用したヒトラクトフェリンの医薬展開

村田 大輔

日本ラクトフェリン学会関連ラジオ放送のご案内

第12回国際ラクトフェリン会議(XIIth International Conference on Lactoferrin, Structure, Function and Applications)のご案内

## 巻頭言

## 「Serendipity」

高田 隆

Takashi TAKATA

広島大学大学院

医歯薬保健学研究院

口腔顎顔面病理病態学 教授

私は「セレンディピティ(serendipity)」という言葉が好きで、折に触れて紹介させていただいています。最近ではJR西日本のCMで「明日セレンディピティ.素敵な偶然に会いに行きませんか」と言うフレーズで放映され、誰もが知る言葉になったようです。セレンディピティという言葉は、ホレス・ウォルポールというイギリスの小説家とその小説の中で使った造語で、「セレンディップ3人の王子」という童話にちなんだ言葉とされています。その童話は、王子達が旅の途中にいくつかの意外な出来事に像遇し、もともと探していなかった何かを発見する物語です。Wikipediaには、「セレンディピティとは、何かを探しているときに、探しているものとは別の価値あるものを見つける能力・才能を指す言葉である。」とあり、偶発力という訳をあてる人もいます。科学の世界では、フレミングがアオカビのコンタミによる阻止円に気付いてペニシリンを発見したことやキューリー夫妻が抽出物残渣の中にラジウムを発見したことが例としてあげられています。一方で、パスツールは”Chance favors the prepared mind”と述べています。すなわち、偶然は確率的のみに現れるのではなく必然を含み、幸運な発見は備えある心に訪れます。

私は縁あってラクトフェリンを研究する機会をいただき、研究室では骨破壊性病変や腫瘍に対する作用を検討しています。これまでの研究で、ラクトフェリンには抗炎症作用、破骨細胞形成阻害作用、骨芽細胞分化促進作用、抗腫瘍作用、腫瘍関連血管内皮細胞に対する選択的抑制作用などの様々な生物活性があることを明らかにしてきました。ラクトフェリン学会では、参加させていただく度に新しい活性

があることを聞かせていただき、こんなに多機能な分子は他にないのではないかと  
思います。今後も洞察力を磨いてラクトフェリン研究に取り組みたいと思います。ラ  
クトフェリンは生体に優しく寛容で奥深い分子です。しかし、その多機能さが却って  
要素還元主義的生物學に受け入れられにくい側面があることも否めません。しかし  
大変魅力的な研究対象であることに違いはなく、今後はラクトフェリンの有する作  
用の分子レベルでのメカニズム解析と活性部位の同定とそれに基づく機能付加に  
関する研究が進むと考えます。

本年は大変幸運なことに、日本ラクトフェリン学会理事長の津田洋幸先生ご主  
催の第12回国際ラクトフェリン会議が、11月2日-6日に名古屋で開催されます。  
世界のラクトフェリン研究者が一堂に会して最新の情報を共有する中に、きっとたく  
さんの幸運な発見があるように思います。本ニュースレターの読者の皆様にはお誘  
い合わせの上、是非ご参加いただき、セレンディピティ巡り会っていただきたいと願  
います。

追記：私がセレンディピティという言葉と出会ったきっかけは、2001年に上映されたクリスマ  
スのニューヨークを舞台にしたセレンディピティという映画でした。ニューヨークのブルーミン  
グデールズという古いデパートの手袋売り場から出会いが始まり、偶然に偶然が重なって男  
女が結ばれるロマンティックラブストーリーです。映画を見た年のクリスマスに、家内と二人  
でニューヨークに行って、映画の舞台となったブルーミングデールズと二人が再会するセ  
レンディピティ3というカフェ(<http://www.serendipity3.com/>)を訪れて、Frozen Hot  
Chocolateを二人で一つ注文しました。少し幸せな気分になりました。機会があったらお立  
ち寄りください。

## 学術集会開催報告

## 第6回学術集会を振り返って

高山 喜晴

Yoshiharu TAKAYAMA

農業・食品産業技術総合研究機構

畜産草地研究所

(第6回 学術集会 実行委員長)

2014年11月8日に、茨城県つくば市で開催されました本学会の第6回学術集会の概要について、大会実行委員長として報告させていただきます。

今回の学術集会は、島崎敬一先生のお世話により、本学会の前身となる第1回ラクトフェリンフォーラムが、2004年に開催されてから、10周年の節目の大会であります。ラクトフェリンの多機能性を反映して、基礎・応用ともにラクトフェリンに関する論文数は増加を続けています。このような中、今回の学術集会のテーマは、原点に立ち戻る意味で、「ラクトフェリン機能の解明から利用に向けたグランドデザインの構築」といたしました。特別講演のほか、シンポジウム6演題、一般口演12演題、ポスター発表19演題の合計38演題にのぼり、医学・歯学・農学・工学など幅広い立場から発表していただきました。特別講演として、テキサス大学サウスウェスタンメ

ディカルセンターのヨアヒム・ハーツ教授に”Lipoprotein receptors Health and Disease”と題してご講演いただきました。ヨアヒム・ハーツ教授はラクトフェリン受容体の一つであるLDL受容体関連タンパク質(LDL Receptor related protein)を始めとするリポ蛋白質受容体研究の第一人者であり、長年にわたり、これらの機能解析を精力的に行ってこられました。特別講演では、LRPの構造・機能から、リポ蛋白質受容体の多型が、アルツハイマー病発症に関わるメカニズムについて最新の知見まで、これまでの研究について概説していただきました。参加者の関心も高く、フロアから多くのご質問が寄せられました。

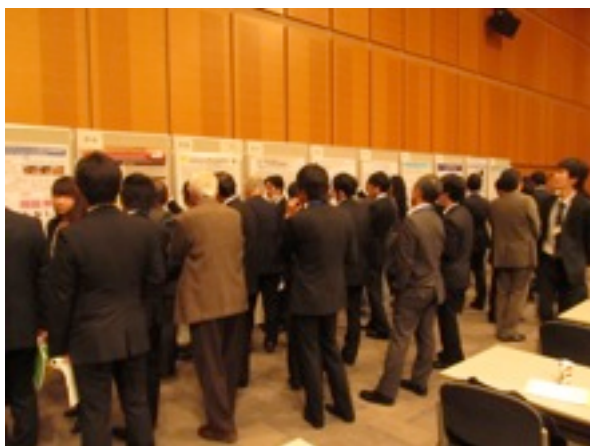
また、今学術集会では「ラクトフェリンの医薬品としての利用を考える」をテーマとしてシンポジウムを企画しました。このシンポジウムの趣旨は、試験研究に用いるラク



大会受付の様子



ヨアヒム・ハーツ教授による招待講演



### ポスター会場での討論の様子

トフェリンの評価と、ラクtoferrinの修飾等によるドラッグ・デリバリー・システムの確立、およびそれらの応用と将来の展望について議論していただくことです。

ラクtoferrinの機能を研究する上での大きな問題として、種差・鉄飽和度による機能の違いや精製標品の夾雑物混入が挙げられます。このため、ラクtoferrinを様々な分野への応用する場合、緻密な実証が要求されます。そこで本シンポジウムでは、最初にNRLファーマの桑田英文氏から、試験研究に用いるラクtoferrinの機能を評価するための様々なモデル系の構築と、これらの系を用いたラクtoferrin標品の機能の比較について論じていただきました。

ヒトラクtoferrinの利用・機能の解明を進めるためには、組み換えラクtoferrinの作成は重要な技術です。第2席の旭硝子(株)の萩谷裕一郎博士からは、分裂酵母を用いた新たなヒト・ラクtoferrinの発現系についてご紹介いただきました。

さらに、第3席の東京工科大学大学院の佐藤淳先生から、ラクtoferrinの生体内での分解を回避するための技術として、PEG(ポリエチレングリコール)化による修飾と、ヒトラクtoferrinとFcとの融合タンパク質作成という二つの方法についてご講演していただきました。

シンポジウムの後半では、第4席にサラヤ(株)の鈴木靖志博士にラクtoferrinに皮膚の角質層を透過させる目的で、界面活性剤であるソホロリピッドとラクtoferrin



### 学会賞・富田賞の表彰式の模様

を組み合わせた研究をご紹介いただきました。また、第5席の広島大学大学院の柳沢俊良先生から、リポゾーム化したラクtoferrinを関節リウマチの病態進行を抑制するために用いた例を報告いただきました。

シンポジウムの最後の演題として、慶応大学の平橋淳一先生に、ラクtoferrinが炎症を軽減する新たなメカニズムとして、ラクtoferrinがNETsと呼ばれる好中球からのクロマチン繊維の放出現象を抑制する現象について報告されました。また、これに関連して、ラクtoferrinが血栓性疾患の抑制に利用できる可能性についても言及していただき、ラクtoferrinの展望を見据えたシンポジウムになったと思います。各セッションでご発表頂きました方々、座長の先生方に改めてお礼を申し上げます。

懇親会はエポカルつくば内のレストラン・エスポワールで開催されましたが、多数のご参加をいただき、相互の親交を深めていただけたものと存じます。席上では学会賞ならびに富田賞の受賞者が発表され、表彰式が執り行われました。受賞研究の詳細については、順次ラクtoferrin学会ニュースレターで紹介する予定です。

本学術集会在盛会のうちに終了しましたのは、各方面の多大なるご協力の賜物であり、改めて本学術集会在多大なるご協力・協賛をいただきました関係者の皆様に改めて深く感謝申し上げます。

## IgG Fc融合技術を応用した ヒトラクトフェリンの医薬品展開

村田 大輔

Daisuke MURATA

東京工科大学大学院

バイオ情報メディア研究科

我々はIgG Fc融合技術を応用して、hinge部が異なるヒトラクトフェリン(hLF)-Fc融合タンパク質を2種類創製した。両者の融合タンパク質はLFとしての活性をほぼ完全に保持し、血中での大幅な安定性の向上を示した。特にhinge欠失型hLF-Fc融合タンパク質は、Fc領域を介する免疫エフェクター活性を示さないことから、経口製剤のみならず注射剤としての展開が期待される。

ヒトラクトフェリン (hLF) は、分子量約80 kDaの鉄結合性タンパク質であり、多様な生理活性を有していることから、医薬品としての展開が期待されている。しかし、血中半減期が短いために、投与されると即座に代謝されてしまい、十分な効果が期待できないという問題点がある。なお、ラットによる血中安定性試験では、hLFの血中半減期は約12.6分であった(Shigaら、2015)。

LFの低血中安定性を克服するため、我々はタンパク質医薬品の安定性向上技術として確立されているIgG Fc融合技術 (Jazayeriら、2008) やポリエチレングリコール (PEG) 修飾技術 (Sugiyamaら、2009) に着目した。IgG Fc融合技術とは、免疫グロブリンG (IgG) のFc領域 (hinge、CH2、CH3の3ドメイン) と目的タンパク質を融合させる技術である。IgG Fc融合に伴う安定化は、抗体の血中での安定化に関与するneonatal Fc receptor (FcRn) とIgG Fc領域間の相互作用に起因する (Zalevshyら、2010)。この技術を応用して、我々はhLFとIgG Fc領域の融合タンパク質(hLF-Fc融合タンパ

ク質)であるhLF-hinge-CH2-CH3 (Shigaら、2015) を構築した。

しかし、従来のIgG Fc融合技術では、hinge部を含むFc領域が免疫エフェクター活性 (Dall'Acquaら、2006) をもたらす可能性がある。具体的な免疫エフェクター活性には、エフェクター細胞による抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性や、補体による補体依存性細胞傷害 (CDC) 活性があり、従来のhLF-Fc融合タンパク質はFcを介して、これらの細胞傷害を引き起こし、副作用をもたらす可能性がある。

さらに、遺伝子組換えを行う際に使用する宿主によっては、付加される糖鎖構造が免疫原性を有する可能性が考えられた。

そこで我々は、以上の問題を克服する目的で、hinge欠失型hLF-IgG Fc(CH2-CH3) 融合タンパク質 (hLF-CH2-CH3) の創製、さらにタンパク質医薬品生産で実績のあるチャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO細胞) を宿主とした発現 (Kruzelら、2013)を試みた。

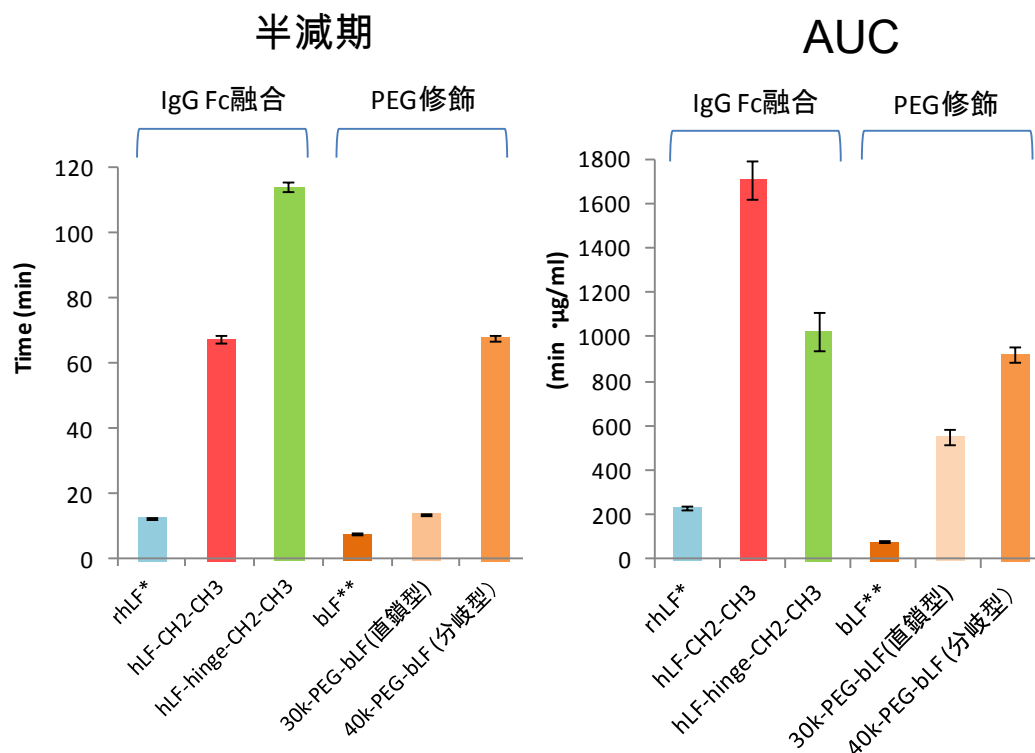


図1 ラットにおけるタンパク質の血中安定性 (図左: 半減期 右: 血中濃度曲線下面積(AUC))

\**Aspergillus*由来 \*\*ウシ由来 (n=5~6)

本稿では、hLF-hinge-CH2-CH3とhLF-CH2-CH3の両hLF-Fc融合タンパク質に関して、*Aspergillus*を用いて作製した組換え型hLF (rhLF) をコントロールとしたLFとしての活性、ラットにおける血中安定性、ならびにエフェクター機能活性化能の有無を評価した。

## 1. LFとしての活性の評価

LFとしての活性として、透析法に基づく鉄結合活性 (Nojimaら、2008) と、ヒト小腸上皮様細胞Caco-2への細胞内取り込み (Ashidaら、2004) を調べた。コントロールとして、*Aspergillus*で作製した組換え型LF (rhLF) を用いた。

各実験の結果、両hLF-Fc融合タンパク質はrhLFとほぼ同等の鉄結合活性を保持すること、ならびにrhLFと同様に、37℃でCaco-2細胞内へ取り込まれることを確認した。さらに、細胞内取り込み後のCaco-2 lysateを、抗hLF抗体を用いたWestern blot法で調べたところ、

両hLF-Fc融合タンパク質は、完全な形で細胞内に取り込まれることを確認した。(データ略)

## 2. ラットを用いた血中安定性試験

ラットの外頸静脈に採血用のカニューレを留置し、大腿静脈内注射によりrhLFおよび両hLF-Fc融合タンパク質を、各々LF換算量で1mg/kgで投与した。その後、一定時間ごとに血液を採取し、ラット血漿中のLF濃度を、Assay Max Lactoferrin ELISA kit (AssayPro) により測定した。

その結果、Fc領域をもつ両hLF-Fc融合タンパク質は、rhLFと比較して、血中半減期の延長、および血中濃度曲線下面積 (AUC) の増加を示した。また、以前に報告したPEG修飾ウシLF (bLF) と比較して、その血中安定性は同等以上であった。(図1)

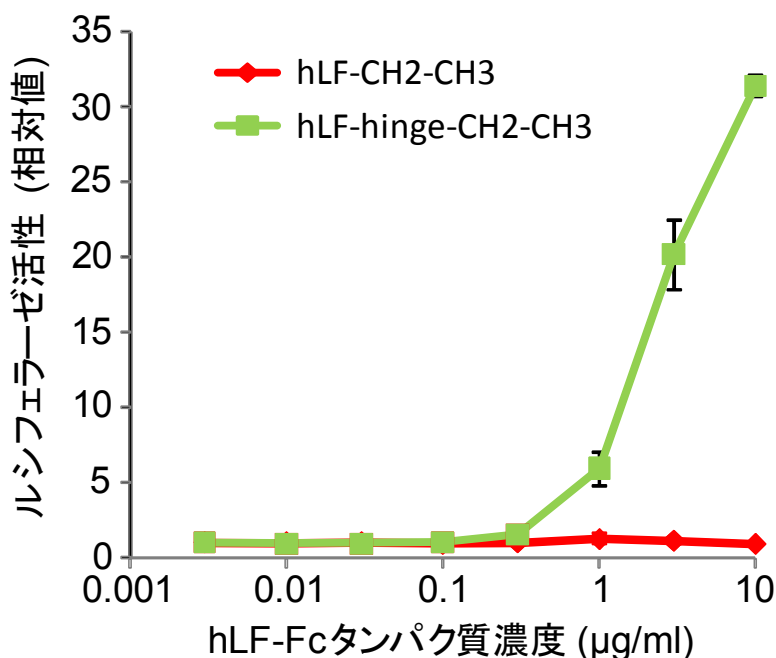


図2 ルシフェラーゼレポーターアッセイによるFcγRIIIa結合依存性なADCC活性

### 3. 免疫エフェクター細胞活性化機能の評価

両hLF-Fc融合タンパク質の、ルシフェラーゼレポーターアッセイによるADCC活性と、CDC活性に関与するヒト補体C1qとの結合評価を行った。ADCC活性の検討では、エフェクター細胞のモデルであるT細胞由来のJurkat細胞膜上に、Fcγ受容体IIIa (FcγRIIIa)とカルシウムシグナル応答性のレポーター遺伝子を強制発現させた細胞 (Jurkat/FcγRIIIa/NFAT-Luc) を使用した。Fc領域を介したFcγRIIIa活性化により誘導されたルシフェラーゼの活性は、Promega One-Glo Luciferase Assay (Promega) を用いて測定した。

その結果、hLF-CH2-CH3はルシフェラーゼ活性の増加を示さなかったが、hLF-hinge-CH2-CH3は、濃度依存的なルシフェラーゼ活性の増加を示した。(図2) また、C1qとの結合試験では、hLF-CH2-CH3は結合を示さず、hLF-hinge-CH2-CH3は結合を示した。(データ略)

以上より、hLF-CH2-CH3は期待通り免疫エフェクター活性を示さないことを確認した。

### 4. まとめ

両hLF-IgG Fc融合タンパク質は、LFとしての活性を保持、かつ大幅な血中安定性の向上を示した。特に、副作用につながる免疫エフェクター活性を示さないhinge欠失型hLF-CH2-CH3は、LFの創薬シーズとなることが期待される。

### 参考文献

Shiga Y, Oshima Y, Kojima Y, Sugimoto A, Tamaki N et al. : Recombinant human lactoferrin-Fc fusion with an improved plasma half-life. *Eur J Pharm Sci* 67 : 136-43, 2015

Jazayeri J A, Carroll G J : Fc-based cytokines : Prospects for engineering superior therapeutics. *Biodrugs* 22 : 11-26, 2008.

Sugiyama A, Sato A, Takeuchi T : PEGylated lactoferrin enhanced its hepatoprotective effects on acute liver injury induced by carbon tetrachloride in rats. *Food Chem Toxicol* 47:1463-1458, 2009.

Zalevshy J, Chamberlain A K, Horton H M, Karki S, Leung I W et al. : Enhanced antibody half-life improves in vivo activity. *Nat Biotechnol* 28 : 157-159, 2010.

Dall'Acqua WF, Cook KE, Damschroder MM, Woods RM, Wu H : Modulation of the effector functions of a human IgG1 through engineering of its hinge region. *J Immunol* 177 : 1129-1138, 2006

Kruzel M L, Actor J K, Zimecki M, Wise J, Ploszaj P et al. : Novel recombinant human lactoferrin: Differential activation of oxidative stress related gene expression. *J Biotechnol* 168 : 666-675, 2013..

Nojima Y, Suzuki Y, Iguchi K, Shiga T, Iwata A et al. : Development of Poly(ethylene glycol) Conjugated Lactoferrin for Oral Administration. *Bioconjug Chem* 19 : 2253-2259, 2008.

Ashida K, Sasaki H, Suzuki Y A, Linnerdal B : Cellular internalization of lactoferrin in intestinal epithelial cells. *Biometals* 17 : 311-315, 2004.

### 謝辞

本研究の遂行にあたり、ご指導を賜りました東京工科大学大学院、バイオ・情報メディア研究科の佐藤淳先生に感謝申し上げます。ならびに、共同研究先である国立医薬品食品衛生研究所の多田稔博士、石井明子博士、(株) NRLファーマの加賀谷伸治氏、星野達雄博士、鳥取大学農学部の竹内崇先生に感謝の意を表します。



# 日本ラクトフェリン学会関係ラジオ放送のご案内

ラジオNIKKEI(旧ラジオたんぱ)の番組「医療ジャーナル」で、日本ラクトフェリン学会関連のシリーズ番組が7回にわたり放送されましたので、ご案内いたします。下記の番組タイトルをクリックしていただくとオンデマンドで番組がお聞きになれます。各回とも放送時間は15分です。

## 1 [【前編】ラクトフェリンの生理機能と研究の最前線](#)

高山喜晴先生

## 2 [【後編】ラクトフェリンの臨床応用と日本ラクトフェリン学会の役割](#)

津田洋幸先生 田中克明先生

## 3 [日本ラクトフェリン学会・第6回学術集会から\(1\)](#)

高田隆先生 (聞き手) 島崎敬一先生

柳沢俊良先生(広島大学大学院) が富田賞を受賞された「リポソーム化ウシラクトフェリンは関節リウマチの病態進行を抑制する」の研究紹介

## 4 [日本ラクトフェリン学会・第6回学術集会から\(2\)](#)

平橋淳一先生 大久保光修先生 (聞き手) 島崎敬一先生

大久保光修先生(慶応義塾大学) が学会賞を受賞された「ラクトフェリンの電荷的相互作用による好中球細胞外トラップ放出抑制機能」の研究紹介

## 5 [日本ラクトフェリン学会・第6回学術集会から\(3\)](#)

佐藤淳先生 (聞き手) 田中克明先生

村田大輔先生(東京工科大学大学院) が学会賞を受賞された「IgG Fc融合技術を応用したヒトラクトフェリンの医薬品展開」の研究紹介

## 6 [日本ラクトフェリン学会・第6回学術集会から\(4\)](#)

平子誠先生 (聞き手) 津田洋幸先生

富田賞を受賞された(農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所)「ラクトフェリンを含む補助飼料給与が濃厚飼料多給ホルスタイン種乳牛の血液及びルーメン液性状、泌乳及び繁殖成績に及ぼす影響」の研究紹介

## 7 [日本ラクトフェリン学会・第6回学術集会から\(5\)](#)

津田洋幸先生 高山喜晴先生

第6回学術集会の総括と第12回国際ラクトフェリン会議に向けた展望

# 第12回国際ラクトフェリン 会議のご案内

本年11月に、名古屋市で、第12回国際ラクトフェリン会議が開催されます。国内での国際ラクトフェリン会議の開催は、第4回国際ラクトフェリン会議(札幌)以来、実に16年ぶり2度目の開催となります。国内外のラクトフェリン研究者が会する貴重な機会ですので、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。

## 第12回国際ラクトフェリン会議 XIIth International Conference on Lactoferrin, Structure, Function and Applications

会期:2015年11月2日(月)から6日(金)まで

会場:[ウェスティン ナゴヤキャッスル](#)

大会長:津田洋幸理事長(名古屋市立大学)

主催:日本ラクトフェリン学会

共催:臨床ラクトフェリン研究会

後援:農林水産省

なお、国際会議の詳細については下記の公式サイトをご覧ください。

<http://www.lactoferrin-conference.com>

### 【学会事務局】

名古屋市立大学 津田特任研究室

名古屋市瑞穂区田辺通3-1

TEL/FAX 052-836-3497

[12lactoferrin@phar.nagoya-cu.ac.jp](mailto:12lactoferrin@phar.nagoya-cu.ac.jp)>

日本ラクトフェリン  
学会ニュースレター  
第13号 (2015年2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

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

TEL: 045-261-5656

内線1871

FAX: 045-253-9902

E-mail:

[lacto@yokohama-cu.ac.jp](mailto:lacto@yokohama-cu.ac.jp)