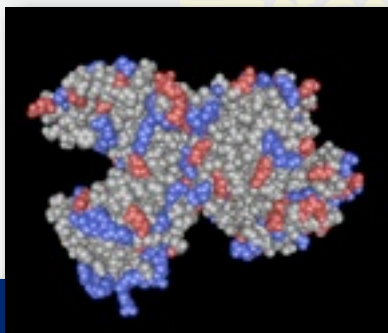


Lactoferrin NEWS

日本ラクトフェリン学会ニュースレター 第10号

2014年2月



1 巻頭言

- これまでのこと、これからのこと 島崎 敬一

2 学会報告

- 第11回国際ラクトフェリン会議参加報告 小野 知二・森下 聡

3 富田賞受賞研究報告

- ラクトフェリン受容体を高発現するヒト腸上皮様 Caco-2 細胞における牛乳ラクトフェリンの取り込みと断片化および放出 秋山 友香

iFIA2014日本ラクトフェリン学会セミナーのお知らせ

巻頭言

“これまでのこと、これからのこと”

島崎 敬一

Kei-ichi SHIMAZAKI

北海道大学 名誉教授

ラクトフェリンが牛乳から見いだされ、1939年に赤色タンパク質として報告されてから75年、国内でのラクトフェリン研究が開始されてから数えても早や50年以上が経ちました。

私がラクトフェリンの精製と抗血清の調製に手を染めたのは帯広畜産大学の助手となった時で、翌1976年の紀要に乳房炎乳に分泌される抗菌性タンパク質濃度について書いたのがラクトフェリンに関する最初の報告でした。その時に目を通したのは、牛乳からラクトフェリンを分離精製するGroves(1960)の報告で、当時はカゼインに結合したラクトフェリンを遊離させてクロマトグラフィーで分離していました。それから10年後に本格的にラクトフェリン研究に取り組むこととなりましたが、目を通したラクトフェリンの論文の中には、いつかは自分もこのようなインパクトのある論文を書きたいものだったものがありました。今となっては古典的な価値しかありませんが、この機会に記憶にある幾つかを紹介したいと思います。なお、インパクトある論文執筆という野望は果たせなかったこと、最初にお断りしておきます。

1960年代には、Nature誌やScience誌にラクトフェリンの抗菌性に関する論文が掲載されていました。1970年代の我が国では、血清トランスフェリンと鉄代謝に関連する医学分野の研究者がラクトフェリンにも関心を向けていた程度でした。他には母乳育児という観点から一部の小児科医や、育児用調整粉乳を作っていた大手の乳業会社が研究対象としていました。たとえば、日本小児科学会誌に児玉が母乳中のラクトフェリンが抗菌作用を示すが、ビフィズス菌に対しては生育促進作用があることを発表しています(1983)。また、高柳らが小児科臨床に書いたラクトフェリンの機能についての解説(1986)があります。その論文の結びに「ラクトフェリンは抗菌物質としてばかりでなく、炎症や免疫のケミカルメディエーターとして今後新たな研究の発展が望まれる」とあり、まさに現在そのようになっていると実感しています。

1980年代はオンラインデータベースの利用が普及の兆しを見せ、研究環境が変わりつつある時期で、ラクトフェリンに関する基礎的な知見が充実してきました。フランスのSpikらのグループによるヒトラクトフェリンの全アミノ酸配列(1984)は、ペプチドシーケンサーを用いる方法でしたが、同じグループのラクトフェリン糖鎖に関する報告とともに私たちの研究に大きな指針を与えてくれるデータでした。その後は遺伝子技術の急速な発展にともなって、クローニング、cDNAからのアミノ酸配列の決定、組換えラクトフェリンの作成、トランスジェニック牛Hermanの作出などの報告が続々と出るようになったことはご存知の通りです。さらにニュージーランドのBakerらのグループが発表したX線結晶解析による高次構造の論文(1987)も衝撃的なもので、ラクトフェリンの立体構造が目に見える形で提示されたのは、ラクトフェリン研究者が待ち望んでいたものでした。また、ヒューストン(USA)のHutchensらのグループによる母乳中のラクトフェリンが乳児の尿に検出されたという報告(1989)も、ラクトフェリンの生理的な機能を考えるうえで示唆に富む論文でした。森永乳業研究グループによる抗菌ペプチド・ラクトフェリシンの最初の論文が発表されたのは1991年で、翌1992年にラクトフェリン・シンポジウム(現在、国際ラクトフェリン会議として継続)がホノルルで開催されることとなったのも、ここで述べたような背景があってラクトフェリン研究の展望が大きく開け、さらに弾みが付いた状況になったためでした。次のステップとしては、さまざまな生体関連物質との相互作用を解明することが、ラクトフェリンの機能発現メカニズムの解読とその応用の鍵を握っていると思われます。

今年の秋には筑波で日本ラクトフェリン学会の第6回学術集会が、さらに来年には名古屋で第12回の国際ラクトフェリン会議が開催されます。ラクトフェリンは研究対象として興味あるだけでなく、その応用において非常に奥深い可能性を秘めています。皆さま方の研究がますます進展するとともに、私どもの健康の維持・向上にラクトフェリンがさらに役立つ道筋を作って頂きたく、今後期待しております。

第11回国際ラクトフェリン学会参加報告

小野 知二・森下 聡

Tomoji ONO, Satoru MORISHITA

ライオン株式会社

生命科学研究所

1. 学会概要

2013年10月6日～10日の5日間にかけて、第11回国際ラクトフェリン学会がイタリアのローマにてSapienza大のPiera Valenti先生の主催で開催されました。本学会は1992年にハワイで第1回大会が開催され、以降ほぼ2年毎に開催されています(表1)。その名の通り、ラクトフェリン(以下、LF)という素材の研究に特化した国際会議であり、たった一つの素材で20年間にも渡り隔年国際会議が開かれることから、LFの機能が多様であり、多面的な研究がなされていることを示しています。本会議は、アジア、ヨーロッパ、北米の地域の持ち回りで開催され、毎回、約150名のLF研究者を集めています。決して大きな会議ではありませんが、国内外の最先端の研究機関のLF研究者と密に情報交換が出来る貴重な場です。

今回もBaker先生、Lönnerdal先生、Vogel先生、Schryvers先生、津田先生、島崎先生らの著名な研究者によるレビューやオリジナルデータに加えて、基礎研究、応用研究の報告が、口頭発表57題、ポスター発表53題、合計110題と、多くの発表がありました。研究分野を主に分類すると表2のとおりです。Plenary lectureはCalifornia大学Davis校のBo Lönnerdal先生が、LFの活性に対する鉄の関与について概説された後、Milan大のGaetano Cairo先生が感染・炎症時の細胞内における鉄の代謝について最近の知見をお話いただきました。主催者のValenti先生がLFと鉄の臨床研究を行われている関係で、鉄にフォーカスしたPlenary lectureとなりました。

回	開催年	開催地
1	1992	Honolulu, Hawaii
2	1995	Honolulu, Hawaii
3	1997	Le Touquet, France
4	1999	札幌、日本
5	2001	Banff, Canada
6	2003	Capri, Italy
7	2005	Honolulu, Hawaii
8	2007	Nice, France
9	2009	北京、中国
10	2011	Mazatlan, Mexico
11	2013	Roma, Italy

表1 国際LF学会の開催年と開催地

日本からは、日本ラクトフェリン学会理事長の名古屋市立大・津田先生をはじめとし、北大・島崎先生、名古屋市立大・飯郷先生、昭和大・大槻先生、農研機構・高山先生、広島大・高田先生、デイリーテクノ・富田社長など、30名程度の研究者が出席し、前回のメキシコ大会から大幅に増えていました(表3)。これもローマという観光名所で開催された効果かもしれません。

学会会場はバチカン市国のサンピエトロ大聖堂に程近いホテルを借りて開催され(写真1)、学会期間中にシスティナ礼拝堂ツアーも組まれていました(写真2)。ミケランジェロらが描いた天井画や壁画は圧巻であり、時



写真1 学会会場風景

(左上)サンピエトロ大聖堂、赤矢印が学会会場のホテル (右上) 口頭発表会場

(左下) ポスター会場 (右下) 受付嬢

表2 各セッションの演題数

セッション名	口頭(件)	ポスター(件)	計
plenary section	2	0	2
LF structure	2	2	4
LF gene expression	2	2	4
LF receptors and localization	4	1	5
LF and immunomodulating activity	5	4	9
LF and iron homeostasis	3	0	3
LF and its derivative peptide	8	9	17
LF and obesity	2	0	2
LF as a biomarker	2	2	4
LF : cell proliferation and differentiation	4	3	7
recombinant and transgenic LF	3	12	15
round table on breast milk and infant formula	3	4	7
round table on LF and neonatal infection	6	2	8
LF application	8	7	15
LF novel use	3	5	8
合計	57	53	110



写真2 システィーナ礼拝堂ツアー

(左) 学会会場ホテルに集合 (右) 館内説明、頭一つ出ているのがBo Lönnerdal先生
礼拝堂は写真撮影不可でした

間が経つのも忘れるぐらいだったのですが、如何せん時間が短いため、すぐそばに有名なラファエロの間があるにもかかわらず足早に出なければなりません。次に来たときにはじっくり見物できればと思います。余談ですが、Calgary大のVogel先生は、LF中に存在するシステイン(cysteine)結合とシスティーナ(Sistina)礼拝堂を引っ掛けてご講演されたり、システィーナ礼拝堂のミケランジェロの天井画が米国医師会雑誌JAMAで取上げられたこともご説明されていました。ミケランジェロは解剖学に関しても造詣が深く、「アダム」の創造」という天井画に描かれた神は、実は脳の形をしているという解釈ができるそうです。神は人間の頭の中に宿っているということでしょうか？アダム」の創造を行ったのは神ですが、その神を創造したのは人間である。当時、そんなことをおっぴらに口にすることは出来なかったでしょうから、せめてその考えを絵画の中に描いたものと想像されます。翌日にシスティーナ礼拝堂ツアーが控えていることも踏まえて、とてもユーモアのあるご講演をされていたのが印象的でした。

2. 基礎研究分野のトピック

表2に示すように、基礎研究分野としては、LFの構造、遺伝子発現、受容体、免疫調節機能、ペプチド、などを中心に発表がありました。その中で筆者の独断とな

り恐縮ですが、興味深かった演題に関してご紹介いたします。

大久保先生(東大)らは、免疫細胞である「好中球」に対するLFの新しい作用に関してご報告され、日本人では初めてStudent Awardsに選ばれました。好中球は外来病原菌などの異物に対して、貪食作用や、脱顆粒、また、内在性のLFを放出することにより、外敵を除去していると考えられています。近年、好中球の新たな機能として自己DNAを網のように広範に放出することによる捕獲機能(neutrophil extracellular traps (NETs))が明らかにされました。一方、このNETsは、自己免疫疾患や炎症性疾患及び血栓形成の進展に関わるとの報告もされており、生体防御とその防御機構の破綻の両側面に関与する作用として認知されつつあります。本報告では、好中球には高濃度でLFが存在し、外敵認識時に放出されることに着目し、LFがNETs形成に与える影響を解析しました。その結果、hLFやbLFをin vitroで好中球に添加するとNETsの形成が阻害されることを明らかにしました。そのメカニズムとして、カチオン性のLFがアニオン性のDNAに結合し、NETsをシュリンクさせることを示していました。また、動物でのエビデンスも紹介され、自己免疫疾患による血管炎モデルや血栓モデルマウスに対してbLFの投与が有効であることが示されました。内因性LFが自己免疫疾患の調整を行っているという非常に新しい知見であり、食品成分とし



写真3 ガラディナー

(左) 昭和大学とサラヤさんのテーブル (右) 宴もたけなわ

て日本国内で広く使用されているbLFでも効果が認められたことから、bLFの日常的な摂取による自己免疫疾患の予防・改善につながる可能性を秘めたインパクトあるデータでありました。今後、本研究の動向は是非とも注目していきたいと思います。

Sokolovらは、アルツハイマー病(AD)の発症への関与が報告されている好中球に含まれる顆粒の中に、LFとミエロペルオキシダーゼ(MPO)が含まれていること、さらに急性期タンパク質であるセルロプラスミン(CP)と3者の複合体を形成することに着目し、これら血中炎症メディエーターのAD診断前の判定マーカーとしての可能性を検討しています。本研究では、3つのステージ(mild, moderate, severe)の37名のAD患者と32名の健常人を被験者とし、ADの判定はICD-10(1994年に世界保健機関が設定した研究用診断基準、International Classification of Disease 10th revision)とNINCDS-ADRDA(米国国立神経障害・脳卒中研究所とアルツハイマー病・関連障害協会が1984年に合同で作成)で行いました。その結果、AD患者において、CP活性の低下、LF濃度の減少及びMPO濃度の減少が有意に認められました($P < 0.0001$)。これらのマーカーの変動はmildのステージにおいて既に有意差が認められており、血漿LF、MPOの減少及びCPの活性低下は、好中球の機能変化に付随して起きていることが示唆され、ADの早期診断マーカーとしての利用の可

能性が考えられました。症状が顕在化してからの対処は医薬品ですら満足できるものがなく、予防技術の開発が今のポイントとなっています。そのためには、早期診断マーカーの確保が非常に重要であり、本報告はそのマーカーとしてLFが活用できるのではないかとこのことで非常に興味深かったです。しかし、ポスターの前で待っていたにも関わらず、演者とディスカッションできず非常に残念でした。論文もまだ公開されていないようですので、今後の動向を見守ってきたいと思います。

3. 応用研究分野のトピックス

今回の学会で応用研究分野に関するトピックスの特徴は、母子に対するLFの作用にフォーカスを当てていた点かと思います。中でも妊婦の鉄欠乏性貧血に対する研究と、乳児に対するLFの有用性に関する研究が目を引きました。

鉄欠乏症は世界で最も一般的な栄養障害であり、その数は世界で20億人にも上ります。鉄欠乏症、貧血は仕事の効率を下げるため、経済的に不利益であり、鉄欠乏症・貧血への対処により生産性を20%上げられるということがWHOから報告されており、鉄欠乏症に対する対処は大きな社会的な意義があります。鉄欠乏症、貧血は特に妊婦に多く、発展途上国では56%、先進国でも14%程度が鉄欠乏性貧血であり、死産、早産、低体重児出産、新生児の死亡率、等のリスクを上げるほか、新



写真4 ローマの休日(ではなく平日です)

(左)トレヴィの泉でコインを投げる森下 (右)コロッセオを歩く森下

生児の鉄状態悪化は、母子のコミュニケーション悪化、認知機能、言語能力、運動能力発達遅延にも繋がるそうです。これまでにValenti先生の研究グループから、鉄欠乏性貧血に対するbLFの有効性を、鉄剤(FeSO_4)と比較された報告があり、bLFは血中の鉄、ヘモグロビン、フェリチン、赤血球などのパラメーターを改善するほか、炎症マーカーであるIL-6の濃度を下げることがわかっています。逆に鉄剤は、LFほどの効果が認められないほか、IL-6についてはむしろ濃度が上昇しており、吐き気、便秘、腹痛などの副作用もあることから、決してベストな治療法ではないことを報告されていました(Int J Immunopathol Pharmacol. 23, p577-87, 2010)。今回の学会では、Valenti先生より遺伝性血栓症の妊婦に対するbLFの有効性についてご報告がありました。242名の患者をbLF投与群と FeSO_4 投与群の2群に分けて試験をしたところ、前述の試験結果とほぼ同様の結果が得られておりbLFの有用性が示されました。特筆すべきはその副作用のなさで、 FeSO_4 投与群では、114名中38名が副作用、流産などで試験をリタイアしていましたが、bLF投与群では128名中126名が試験を完了しており、副作用、流産などは1名もいっしかなかったとのこと。妊婦の鉄欠乏性貧血に関する研究では、現在Lactoferrin in Anaemia of Pregnancy Collaborative Study Groupという研究グ

ループがイタリア、オーストラリア、イギリスで形成されています。今回の学会でオーストラリアの研究グループから、鉄欠乏性貧血妊婦を対象とし、上述と同様の試験を800名規模で実施する計画があることをご報告されており、今後の研究の発展が非常に期待できる分野だと感じました。結果次第では、20億人の貧血患者のファーストチョイスになるかもしれないと締めくくられておりました。

乳児に対するLFの応用では、遅発性敗血症や壊死性腸炎等に関するご報告がMissouri大のSherman先生、Peruana Cayetano Heredia大のOchoa先生、Sant'Anna 病院のManzoni先生らからありました。壊死性腸炎や敗血症は特に早期産児によく起こるそうで、日本では年々早産、低体重児出産の傾向が強まっていることから、今後国内でも重要な課題になるかもしれません。この分野では、2009年にManzoni先生がJAMAに投稿された論文が有名です。この論文では、出生時体重1500g以下の472名の乳児をbLF100 mg群、bLF100mg+乳酸菌(*Lactobacillus* GG 60億個)群、プラセボ群の3群に分けて試験をしました。その結果、遅発性の敗血症の発症率はbLF群で5.9% (RR=0.34)、bLF+乳酸菌群で4.6% (RR=0.27)、プラセボ群で17.3%であり、bLF、bLF+乳酸菌群で有意に発症率を抑制しました。また壊死性腸炎の発症率で

表3 日本人発表者リスト

名前	所属	タイトル
口頭発表 15件		
Hidefumi KUWATA	NRLファーマ	Evaluating the conformation-dependent activities of lactoferrin for rigorous quality control
Jasushi SUZUKI	サラヤ	Lactoferrin can be internalized by dermal fibroblasts and stimulates gene expression
Yuka AKIJAMA	名古屋大学	Subcellular co-localization with intelectin-1 and polarized release of lactoferrin internalized by human intestinal epithelial-cell lines
Koshu Okubo	東京大学	Lactoferrin a suppressor of neutrophil extracellular traps in inflammation
Masaaki IIGO	名古屋市立大学	Effect of oral ingestion of bovine lactoferrin on immune cells in the large intestine and polyps
Kei-ichi SHIMAZAKI	北海道大学	Lactoferrin as a prophylactic and therapeutic agent for bovine mastitis
Tomoji ONO	ライオン	Reducing Effect of Enteric-coated Lactoferrin on Visceral Fat Accumulation in Japanese Men and Women with Abdominal Obesity and its Possible Mechanisms
Satoru MORISHITA	ライオン	Potent lipolytic action of lactoferrin in rat mature adipocytes and its molecular mechanism
Toshihiro INUBUSHI	広島大学	Bovine lactoferrin enhances osteogenesis through TGF-beta receptor signaling.
Hirotsugu ODA	森永乳業	Generation of a Bifidogenic peptide, BLP by pepsin hydrolysis of bovine lactoferrin
Hiroyuki TSUDA	名古屋市立大学	Inhibition of intestinal polyp growth by oral ingestion of bovine lactoferrin and immune cells in the large intestine
Hiroyuki WAKABAYASHI	森永乳業	Protective effect of lactoferrin against familiar infections caused by viral pathogens including norovirus
Tomohiro OBA	昭和大学	Efficacy of lactoferrin in a patient with multiple episodes of recurrent pregnancy loss thought to be caused by refractory bacterial vaginosis
Manabu NAKANO	森永乳業	Effects of bovine lactoferrin and lactoperoxidase-containing tablets on oral malodor and periodontitis
Takashi TAKATA	広島大学	Oral administration of liposomal bovine lactoferrin is useful for prevention and control of periodontitis

も前述の3群でそれぞれ1.9% (RR=0.24)、0% (RR=0.11)、6.0%であり、こちらも有意に発症率を抑制しており、bLFの有効性が大いに期待できる結果でした(JAMA. 302, p1421-8, 2009)。JAMAでの発表後も引き続き試験は推進されており、800名まで症例登録を増やし、重度の壊死性腸炎や死亡率を抑制できるか検討されていました。既に752名まで症例登録が進ん

でおりましたが、この結果においても重度壊死性腸炎または死亡の発生率は、bLF群で4.0% (RR=0.39)、bLF+乳酸菌群で3.8% (RR=0.37)、プラセボ群で10.1%であり、bLF、bLF+乳酸菌群で有意に発症率を抑制しました。現在では前述のように、Manzoni先生以外にも低体重児出産の乳児を対象とした壊死性腸炎、遅発性敗血症に対するLFの有効性を検討されている方が増え

表3 日本人発表者リスト(続き)

名前	所属	タイトル
ポスター発表 12件		
Yoshiharu TAKAYAMA	農研機構	Role of CXCR4 on lactoferrin-induced activation of PI-3K signaling pathway
Ken ANDO	東京薬科大学	TLR4-dependent regulation of intestinal immune responses by lactoferrin
Hiroshi KAWAKAMI	共立女子大学	Effects of enteric-coated lactoferrin supplementation on the immune markers in serum of healthy elderly individuals: randomized, double-blind, placebo-controlled trial
Kei-ichi SHIMAZAKI	北海道大学	Screening of functional peptides from transferrin family proteins of marine organism
Chea Chanbora	広島大学	The Inhibitory Effects of Bovine Lactoferrin on Growth and Bone Invasion of Oral Squamous Cell Carcinoma
Toshiaki KOKUBO	放射線医学研究所	The usefulness of lactoferrin to protect against X-ray-induced mouse thymic lymphomas
Nanase ISHII	サラヤ	Effect of lactoferrin in the presence of sophorolipid on melanogenesis in cultured melanocytes
Yuki SHIGA	東京工科大学	Development of a human lactoferrin Fc fusion protein as a pharmaceutical agent
Yuki SHIGA	東京工科大学	Human lactoferrin-IgG Fc fusion protein for therapeutic use
Tomohiro OBA	昭和大学	Efficacy of lactoferrin in a patient with multiple episodes of recurrent pregnancy loss thought to be caused by refractory bacterial vaginosis
Hiroyuki TSUDA	名古屋市立大学	Inhibition of intestinal polyp growth by oral ingestion of bovine lactoferrin and immune cells in the large intestine
Tetsuya KAWAKITA	慶應大学	The Role of Oral Lactoferrin in Dry Eye Patients

てきています。症例数の関係でManzoni先生ほどのきれいな有意差が得られているわけではないようでしたが、それぞれ同様のbLFの有効性が認められていました。LFの作用機序については、腸内菌叢への影響や抗炎症作用などが考えられますが、特にビフィズス菌の増殖促進作用がkeyなのではないかとの議論がありました。ちなみにビフィズス菌といえば森永乳業の織田氏、LF分解物に含まれるビフィズス菌増殖ペプチドBLPのご報告をされておりました。こちらも今後の研究の発展が期待されます。

4.Obesity(肥満)が始めてセッションに

本会では初めてObesityのセッションが設定され、小野より「腸溶bLFのヒトにおける内臓脂肪低減効果(Br J Nutr., 104, p1688-95, 2010)及びマイクロミニピッグに対する動脈硬化予防効果に関して」、森下より「bLFの内臓脂肪低減メカニズムとして、脂肪細胞に対する脂肪分解促進効果(Biosci Biotechnol Biochem., 77, p566-71, 2013)の分子機構に関して」口頭発表しました。本内容につきましては、これまでに本ニュースレターでご報告しているので割愛させていただきますが、発表後、多くの質問が寄せられ、一定の関心を持っ



写真5 大会最終日の様子

(左) 津田先生から次回開催地の日本の名所についての紹介(地獄谷温泉のニホンザルの入浴風景)
(右) 日本人参加者集合写真(最終日だったので全員は取れませんでした。すいません)

て頂けたと感じました。Lönnerdal先生とSchryvers先生からは「bLFの内臓脂肪低減効果は腸内細菌層の変化と関連があるのではないか」とのコメントを頂くなど貴重なご意見を伺えました。ただせっかくセッションができたのですが、発表をしたのは当社の2名のみであり、存在感を示すことができた反面、より多くの研究者にLFと脂質代謝の関係について興味を持って頂きたいと思っております。この分野では鳥取大の竹内先生が2004年にマウスで脂質代謝が改善することを示されたのを皮切りに(Br. J. Nutr., 91, p533-558, 2004)、Moreno-Navarrete先生が血中のLF濃度はBMIや血糖、血中脂質と逆相関するという興味深い報告をされた他(Clin Chem., 54, p301-9, 2008)、細胞レベル、動物レベルでいくつかの報告がされています。中でも疫学研究や細胞実験を幅広く検討されているMoreno-Navarrete先生が、当初Valenti先生から招待されていたので、今回初めてお会いできるかと楽しみにしていたのですが、ご都合が合わなかったようでした。LFと脂質代謝の研究はまだまだ発展途上の段階であり、特にヒトのエビデンスは我々が報告した一報のみでまだまだ十分ではない

と感じています。ご興味のある先生がいらっしゃいましたら、是非一緒に検討をさせて頂ければ有難い限りです。

5.次回開催地は名古屋に決定!

会議期間中に国際組織委員により次回開催地の選考が行われ、2015年に開催される第12回国際ラクトフェリン会議は、本会の津田理事長が組織委員長となり、名古屋で開催されることが決定しました。会議の最終日に、国際組織委員長のBo Lönnerdal 教授から開催地が発表された後、津田理事長より、名古屋市と会議場の概要と、市内・近郊の名所について熱のこもったご紹介がありました(写真5)。日本での国際ラクトフェリン会議は、1999年に北大の島崎先生が組織委員長となった第4回が札幌で開催されて以来、実に16年ぶり2度目となります。これまで国際会議ではなかなか発表できなかった方もいるのではないかと思います。今回は名古屋に海外の著名なLF研究者をお招きして会議を開催できる貴重な機会です。是非多くの研究者に2015年の国際会議への参加・発表して頂き、一緒に本会議を盛り上げて行ければと考えております。

ラクトフェリン受容体を高発現するヒト腸上皮様 Caco-2細胞における牛乳ラクトフェリンの取り込み と断片化および放出

秋山 友香

Yuka AKIYAMA

名古屋大学大学院
生命農学研究科

ラクトフェリン(LF)は腸上皮細胞頂端側に発現するインテレクチン(IntL)を介して細胞内に取り込まれると推定されている。本研究では、IntL安定発現Caco-2細胞を用いて、LFの取り込みとその後の放出、また細胞内局在について解析した。LFは対照タンパク質と比較して効率的に細胞内に取り込まれ、一部は断片化されて培養上清中に放出されること、さらに取り込まれたLFの大部分は核の頂端側近傍においてIntLと共局在することが示唆された。

LFはLF特異受容体として考えられているIntLを介したエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれると推定されている。これまでに、IntLを高発現する形質転換Caco-2細胞において、細胞表面へのLF結合能が増加したこと、また鉄結合型LFとしての鉄吸収量が増加したこと¹⁾が報告され、さらにRNA干渉によって内在性IntLの発現を抑制したCaco-2細胞ではLFの吸収量が

40%まで低下したことが報告されている²⁾。このように、Caco-2細胞によるヒトLFの吸収にIntLの発現量が関与している可能性が示唆されているが、細胞内に吸収されたLFのその後の動態や安定性については明らかとされていない。そこで、IntL依存的に取込まれたLFの細胞内動態についてさらに解明するため、IntL安定過剰発現Caco-2細胞(IntL-Caco-2)を用いて、サンドイッチ

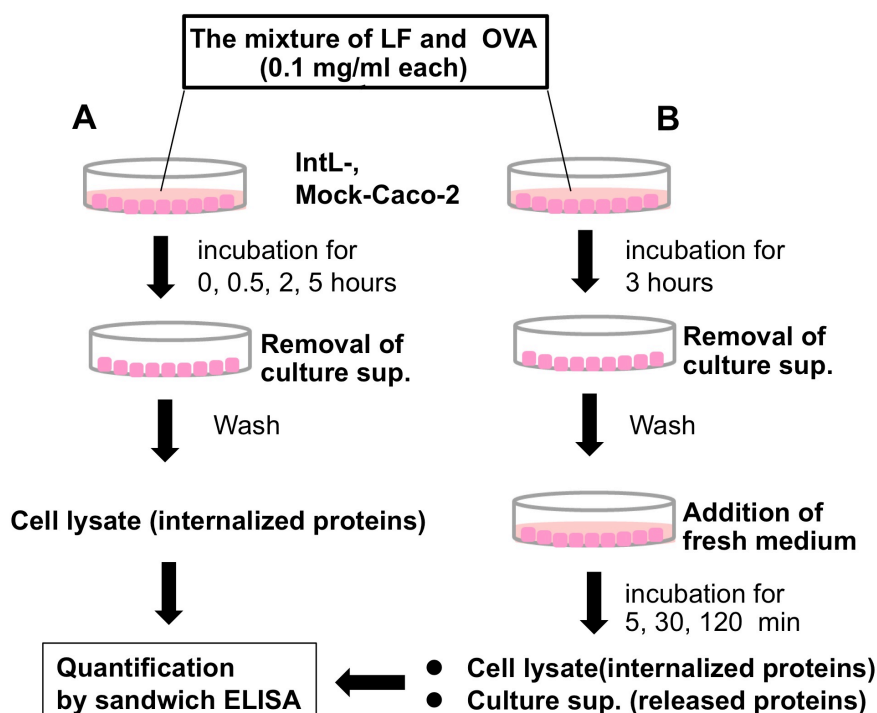


図1 形質転換Caco-2細胞によるLFの取り込み量、および放出量の定量的解析スキーム

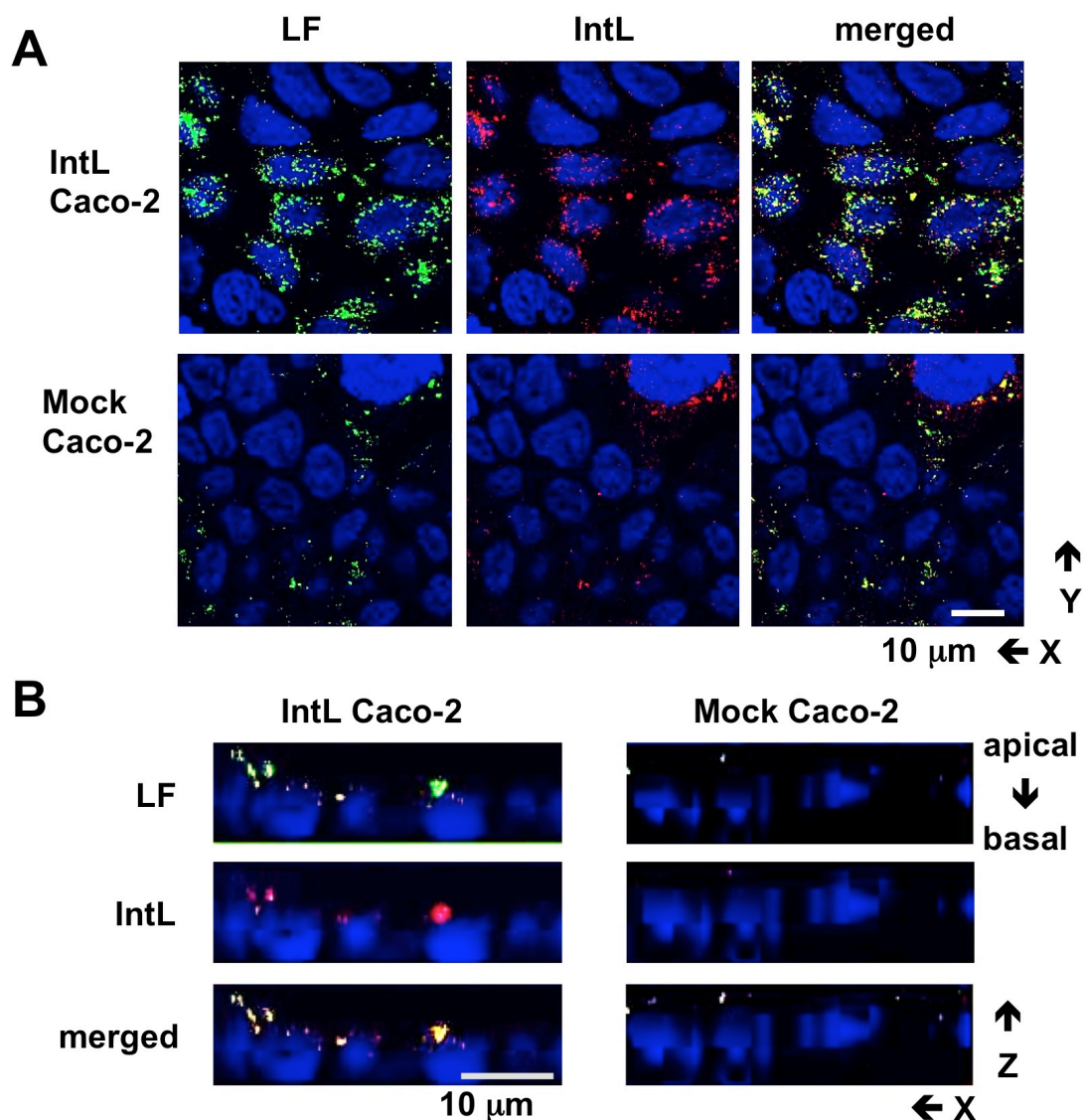


図2 蛍光免疫染色法による形質転換Caco-2 細胞により細胞内に取り込まれたLFおよびIntLの検出

形質転換Caco-2細胞をカバースリップ上で10日間培養した後、培養上清をLF(0.1mg/ml)を含む新しい培地と交換し、3時間培養した。その後細胞を固定し、膜透過処理を行った後、抗LF抗体、抗IntL抗体、および蛍光標識二次抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。共焦点レーザースキャン顕微鏡によりLFおよびIntLを検出した時のX-Y平面画像(A)およびX-Z画像(B)を示した。(緑:LF、赤:IntL、青:核)

ELISAや免疫ブロット法、また共焦点顕微鏡法により、細胞内に吸収されたLFの安定性や細胞内局在について解析した³⁾。

図1Aに示す方法によって、IntL-, Mock-Caco-2細胞により取り込まれるLFの濃度および比較対象としてのOVAの濃度を定量的に解析した。培養時間の増加に伴い、細胞溶解液中に含まれるLFおよびOVAの濃度は上昇した。LFとOVAの取り込み量について、IntL-Caco-2

とMock-Caco-2での有意な差はみられなかったが、細胞溶解液中のLF濃度はOVA濃度の約10倍であり、LFに特異的な細胞内取り込み機構の存在が示唆された。

図1Bに示す方法によって細胞内に取り込まれたタンパク質のその後の動態について定量的に解析した結果、細胞溶解液中のLF濃度は経時的に減少する一方で、培養上清中LF濃度は経時的に増加しており、一旦細胞内に取り込まれたLFは再び培養上清中に放出されるこ

とが示唆された。OVA については、細胞溶解液中の濃度はLFと同様に経時的に減少するが、LFに比べて顕著に低い濃度であった。さらに免疫ブロット法において細胞内に蓄積しているOVAは検出感度以下であったのに対し、大部分のLFは無傷の状態で検出されたことから、LFは細胞内に取り込まれた後一定時間は安定に細胞内に留まることが示唆された。また培養上清中のLFは40 kDa付近のバンドとして検出されたことから、断片化されたLFは速やかに細胞外へ放出されることが示唆された。

次に、蛍光免疫染色法により細胞内に発現するIntL、および培養3時間で細胞内に取り込まれたLFを可視化したところ、IntL-Caco-2細胞において、取り込まれたLFのシグナルがMock-Caco-2と比較して顕著に明瞭であり(図2A)、LFがIntLと頂端側核近傍において共局在している様子が観察された(図2B)。さらに、LF存在下で培養することによってIntL安定過剰発現Caco-2のIntLのシグナルがより明瞭になることから、LFの存在により細胞内でのIntLの局在が変化することが示唆された。

これらの結果より、Caco-2細胞により取り込まれたLFはIntLと結合すること、またLFとの結合によってIntLの細胞内局在が変化し、LFとIntLの複合体としてエンドソームのような特定の細胞内小器官に安定的に蓄積されることが示唆された。このようにIntLは腸管上皮細胞によるLFの取り込みのみならず、取り込まれたLFの細胞内局在および細胞内での安定性に関与する可能性があると考えられる。

参考文献

- 1) Suzuki YA. et al., Biochemistry 40, 15771-15779 (2001)
- 2) Jiang R. et al., J Cell Physiol 226, 3022-3031 (2011)
- 3) Akiyama Y. et al., J Biochem 154, 437-448 (2013)

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、食品研究の専門家のみならず、一般の方にもラクトフェリンに関する知識を深めていただくため、ifia JAPAN 2014で「日本ラクトフェリン学会セミナー」を開催し、5人の講師の先生方に、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。

日本ラクトフェリン学会セミナー

日時：5月21日(水)13:00～16:00

場所：東京ビッグサイト 会議棟

- 平橋淳一先生(東京大学医学部)
- 森下聡氏(ライオン(株)生命科学研究所)
- 大槻克文先生(昭和大学医学部)
- 中野学氏(森永乳業(株)食品基盤研究所)
- 小久保年章先生((独)放射線医学総合研究所)

演題など詳しい情報は、学会ホームページ・次号以降のニュースレターでご案内します。

なお、ifia2014 JAPAN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/index.html>

日本ラクトフェリン 学会ニュースレター 第10号 (2014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

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