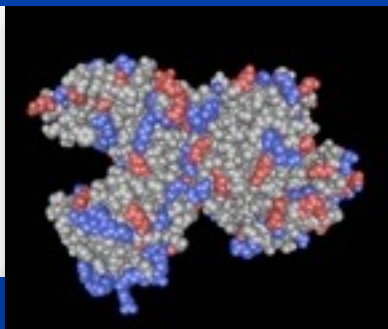


Lactoferrin NEWS

日本ラクトフェリン学会ニュースレター 第14号

2015年6月



巻頭言

第12回国際会議開催にあたって

津田 洋幸

Hiroyuki TSUDA

名古屋市立大学津田特任研究室 教授

1. 巻頭言

第12回国際会議開催にあたって 津田 洋幸

2. 学会賞受賞研究報告

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 大久保 光修

3. セミナー開催報告

HFE/ifaJAPAN2015第3回「日本ラクトフェリン学会セミナー」開催報告 村越 倫明

4. ラクトフェリンセミナープロシーディング<前半>

◆光老化モデルにおけるラクトフェリンの経口摂取による皮膚状態改善効果 村田 麻衣

◆高コレステロール血症・動脈硬化症モデルに対する腸溶ラクトフェリンの有用性とその作用機序について 中村 佳菜恵

国際ラクトフェリン会議は1992年からほぼ隔年に開催され、2015年の本会議で12回目になります。ラクトフェリンは当初見出された抗菌、抗ウィルス、免疫能増強作用に加えて、炎症と感染防御、創傷治癒促進、がん・疾病予防・抗がん作用、中枢神経の発達への関与、鎮痛作用、歯周病治療、肥満予防等について次々と新しい作用が判ってきました。単一の乳タンパク質がこのような多機能を担うということは驚きであり、科学的に魅力のある物質であり、本会議において、さらに多くのことが明らかになると期待されます。今回の国際会議は、11月2日(月)から6日(金)まで名古屋市のWestin Nagoya Castle Hotelにて開催されます。アメリカ、カナダ、メキシコ、南米、ヨーロッパ各国、シンガポール、中国、韓国等およそ30カ国の第一線の研究者が参加します。演題は国内外23人の学術委員によって選考されます。詳細な内容、演題申し込み、登録は国際会議ホームページ<<http://plaza.umin.ac.jp/~lactoferrin12/greeting.html>>をご覧ください。

主なカテゴリーは以下のとおりです：

Structure and gene expression (構造と遺伝子発現)
 Receptors and localization (受容体とその分布)
 Immunomodulating activity (免疫調節作用)
 Recombinant and active peptides (組み換え蛋白質と活性ペプチド)
 Cell proliferation and differentiation (細胞増殖・細胞分化)
 Antimicrobial, antiviral, anti-parasitic activity (抗菌・抗ウィルス・抗寄生虫)
 Neonatal infections (新生児感染症予防と治療)
 Brain and CNS development (脳・中枢神経への作用)
 Chemopreventive and therapeutic applications (がんと疾病予防)
 Dental application (歯科領域への応用)
 Weight gain and body composition and obesity control (体重コントロール)
 Disease biomarker (疾患バイオマーカー)
 Breast milk and Infant formula (母乳・育児用ミルク)
 Pregnancy, perinatal and newborn diseases (妊娠・周産期・新生児疾患)
 Injury repair (創傷治癒効果)

会員の皆様の積極的な学会発表と参加をお待ちしております。

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

大久保 光修

Koshu OKUBO

慶応義塾大学病院

血液浄化・透析センター

好中球は貪食・脱顆粒に加え自らのクロマチン線維から成る好中球細胞外traps: NETsを細胞外に放出し生体を防御する。NETsは外来微生物を捕捉し生体を防御する一方で自己免疫性疾患、炎症性疾患、血栓症の病態に深く関与する。我々は好中球顆粒成分の一つラクトフェリンが活性酸素発生系と独立にNETs形成を抑制すること、放出されたNETsを凝集させることを見出した。ラクトフェリンの炎症性疾患を始めとするNETs関連疾患への応用が期待される。

好中球は貪食、脱顆粒により生体を防御している重要な役割を持つ白血球である。最近、好中球がクロマチン線維および顆粒蛋白から構成される網目状構造物; NETs(neutrophil extracellular traps)を細胞外に放出し外来微生物を捕捉することが新たな生体防御機構として報告されている(図1)。一方でNETsの制御不全は自己免疫性血管炎や、敗血症等の炎症状態、また深部静脈血栓症等の血栓性疾患の病態形成に深く関与していることも明らかにされている。これらのことから安全なNETs制御法の開発は重要な課題となっている。

ラクトフェリン(Lf)は母乳や涙液等の外分泌液や好中球顆粒内に含まれる多機能蛋白であり、炎症状態において生体に保護的に作用するという報告や免疫調整作用を持つという報告がある。臨床的には重症敗血症の新生児においてLfが生命予後を改善させたという無作為化試験があり、Lfの持つ抗炎症効果が注目を集めている。

我々は自己免疫性血管炎の自然発症モデル動物でヒトの急速進行性糸球体腎炎に類似した病態を呈する

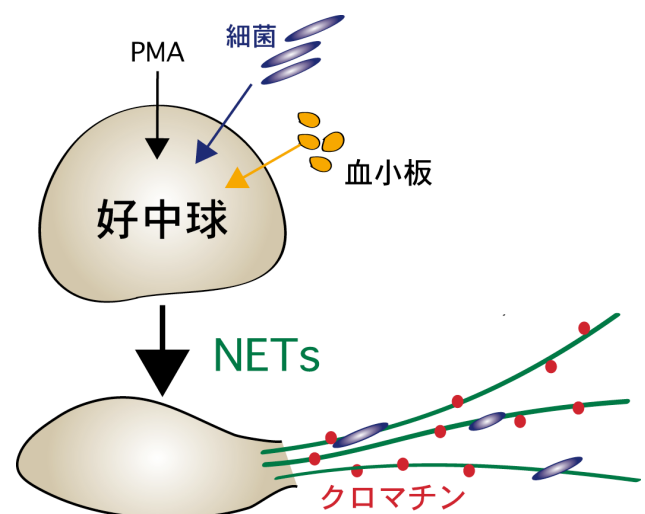


図1 好中球細胞外トラップ(NETs)

SCG/kjマウスの生存を改善させる物質をスクリーニングすることでLfを抽出し、LfがNETsの過剰な産生を抑制し生体に対し保護的に作用するという仮説を立て検証した。ヒト末梢血由来好中球にphorbol 12-myristate 13-acetateによる薬理的な刺激、また、より生理的的刺激として活性化血小板、さらには抗好中球細胞質抗

体といった種々の刺激を加え、各々により惹起されたNETs形成が刺激の種類に関わらず外因性のLfにより顕著に抑制されることを、共焦点顕微鏡下生細胞観察および培養上清DNAの定量を用いて見出した。また、ヒト骨髓球系白血病細胞株であり好中球と同様にNETs形成を起こすことが知られているHL-60細胞では、siRNA処置によるLf蛋白のノックダウンによりNETs形成が増強することが判明し、Lfが内因性のNETs抑制物質であることが示唆された。NETs形成におけるLfの局在を免疫染色により観察したところ、刺激後その局在が細胞質から細胞膜に移行した。また、活性酸素産生を検出するプローブを用いることにより、LfがNETs形成の中心的な役割を持つとされる活性酸素種産生系とは独立してNETs形成を抑制することが分かった。DNA電気泳動によりLfと

NETsが電荷的に結合すること、さらに陽性電荷を消失させたLfではNETs形成の抑制が不可能になることを見出した。また*in vivo*において免疫複合体により惹起されるNETs形成がLf投与によって有意に抑制されることをintravital microscopyにより確認した。本研究において我々はLfがNETs形成の強力な抑制物質であることを発見し、そのメカニズムはLfが持つ強い陽性荷電であると考えられた。敗血症をはじめとした炎症状態や血栓性疾患、あるいは自己免疫性疾患にNETsが深く関連することが明らかにされていることから、Lfがこれらの病態に対する新たな治療薬として臨床応用されることに期待が寄せられる。

HFE / ifia JAPAN 2015

第3回「日本ラクトフェリン学会セミナー」開催報告

村越 倫明

Michiaki MURAKOSHI

ライオン株式会社

生命科学研究所 所長

本学会は、5月20日(水)に、東京ビッグサイトで開催されたHFE/ifa JAPAN 2015(第20回国際食品素材/添加物展・会議、日本食品化学新聞社主宰、出展企業数;443社、来場者数;31,280人)において、第3回「日本ラクトフェリン学会セミナー」を開催しました。本セミナーは隔年開催されている学術集会とは趣を変え、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頂き、健康づくりに役立てて頂くことを目的に開催致しております。お陰様で今年も100名を越える聴講者にご参集頂き、セミナー会場が満席になる程の盛況ぶりでした。

本年のセミナーのテーマは2015年11月2日(月)～6日(金)に名古屋市のウェスティナゴヤキャッスルで開催を予定しております第12回国際ラクトフェリン会議(<http://www.lactoferrin-conference.com/>)のご紹介で、新たに国際学会の実行委員になって頂いた先

生方と、次代を担う若手企業研究者に、ラクトフェリンの様々な機能に関する最新の研究成果について、大変分かりやすく講演して頂きました。詳細につきましては、各講演者のプロシーディングをご参照頂ければと存じます。

本セミナーと国際ラクトフェリン会議が、ラクトフェリンの知名度向上のきっかけになり、ラクトフェリン研究と事業の更なる活性化に繋がれば、大変ありがたいことであると願っております。また、日本への国際ラクトフェリン学会の招聘は、1999年の札幌大会に続き2回目となります。参加者は国内200名、国外150名を予定しております。皆様のふるってのご参加をお待ちしております。

末筆となりますが、本セミナー開催にあたり、講演者の先生方、スタッフの皆様のご尽力に心から感謝申し上げます。



セミナーの様子



セミナーの講演者とスタッフ一同

光老化モデルにおけるラクトフェリンの 経口摂取による皮膚状態改善効果

村田 麻衣

Mai MURATA

森永乳業株式会社

食品基盤研究所

ラクトフェリン(LF)は、抗菌・抗ウイルス作用や抗炎症作用、抗酸化作用など多彩な生理機能を示す乳タンパク質である。哺乳動物の乳や粘膜に存在し、生体がさらされる様々な局面において防御機能を発揮しているものと推察される。

我々の研究グループでは、感染防御作用を起点として、ヒトの健康維持に有用なLFの生理機能について研究を重ねてきた。本稿では、光老化モデルを用いた検討において新たに見出した皮膚老化に対するLFの効果について紹介する。

1. 光老化モデルにおけるLFによる皮膚の保護効果

皮膚は、生体のホメオスタシスを維持し、外界からの刺激や病原体から防御するバリア機構である。紫外線への曝露は、活性酸素の生成や炎症を引き起こし、やがて皮膚のバリア機能の低下や乾燥、しわに代表される光老化を誘導する。

これまでの*in vitro*研究では、LFが紫外線によるDNA障害を減弱すること^{1,2)}、皮膚由来の表皮角化細胞や線維芽細胞の増殖や遊走活性を制御すること^{3,4)}、ヒアルロン酸やコラーゲンの合成を促進すること⁵⁾が報告されている。一方で、*in vivo*におけるLFの皮膚に対する作用は未知であり、我々はLFの摂取が紫外線に対して保護的に作用し皮膚に有益な効果をもたらすことを期待し、光老化モデルを用いて検討を行った。

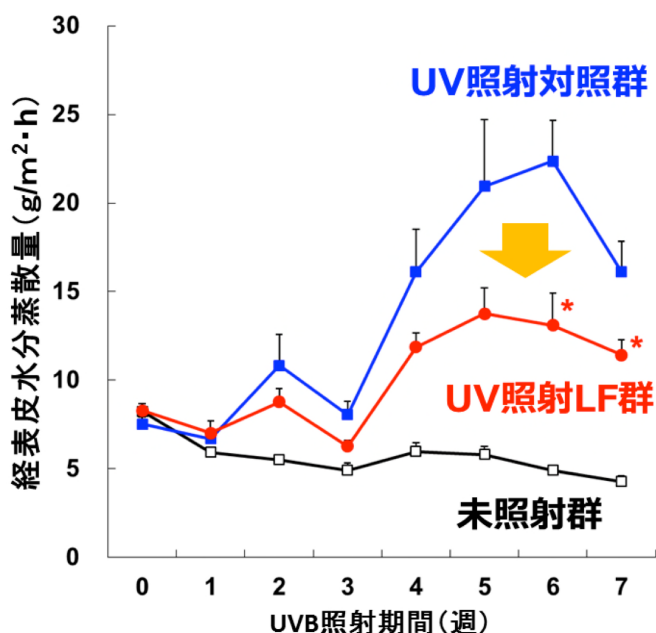


図1 光老化モデルにおけるLFの皮膚バリア機能の改善

*p < 0.05 vs. UV照射対照群
(Murata *et al.*, J Dairy Sci, 2014)

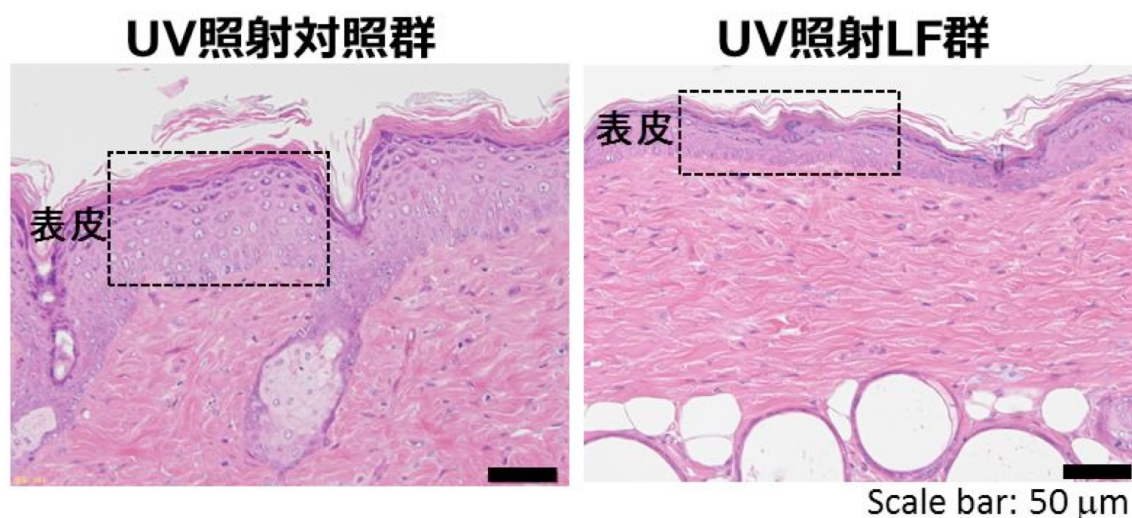


図2 UVB照射による表皮層の肥厚に対するLFの抑制作用

(Murata *et al.*, J Dairy Sci, 2014)

ヘアレスマウスに紫外線B波(UVB)を反復的に照射する光老化モデルを用いて、LFの投与による皮膚バリア機能および皮膚水分量に及ぼす影響を検討した。LF(1600 mg/kg/day)の経口投与と同時にUVB照射による皮膚の光老化を誘導し、皮膚状態の評価を行った。その結果、LFの投与により、皮膚のバリア機能低下が改善し、皮膚水分量の低下が軽減された(図1)。さらに、UVB照射で亢進する皮膚の炎症パラメーター(IL-1)が抑制され、表皮角化細胞の過増殖や重層化を改善する様子が確認された(図2)。これらのことから、LFは皮膚局所における炎症をおさえ、表皮層や基底膜の状態を正常化することで皮膚状態を改善した可能性が示唆された⁶⁾。

2.LF・LF分解物による‘しわ’の予防効果

つぎに、未分解のLFとの比較として、胃消化酵素であるペプシンで加水分解したLF分解物を用いて光老化モデルにおける‘しわ’の予防効果を検証した。LFまたはLF分解物(各50, 200 mg/kg/日)を経口投与しながら反復的にUVB照射し、ヘアレスマウスの背部皮膚に‘しわ’形成を誘導した。その結果、LFおよびLF分解

物の投与により、‘しわ’の深さがいずれも有意に低下していた。さらに病理組織学的観察を行ったところ、表皮層や基底膜の状態に改善が認められた。以上の結果から、ペプシンによる消化を受けたLF分解物においても、LFと同様にUVB照射による表皮の構造変化やバリア機能を改善し、‘しわ’形成を抑制したことが明らかになった(図3)。経口摂取したLFやその分解物は、腸管免疫を介して全身の免疫系へ作用し、さらに抗炎症作用を発揮したと考えられるが、さらなる作用機序の解明が期待される。

総括

本研究では、新たなLFの生理機能として、紫外線による光老化に対する皮膚状態の改善効果を見出した。LFは、ほぼ全ての哺乳類の体内に存在し仔に哺乳する成分である。出生直後の新生児は、胎内とは異なる環境中の病原体や紫外線、活性酸素などのストレス因子にさらされるが、母乳中のLFは急激な環境変化への適応機構として機能していることが考えられる。こうした紫外線に対するLFの防御作用は、乳児のみならず大人における機能性食品素材としても活用が期待される。

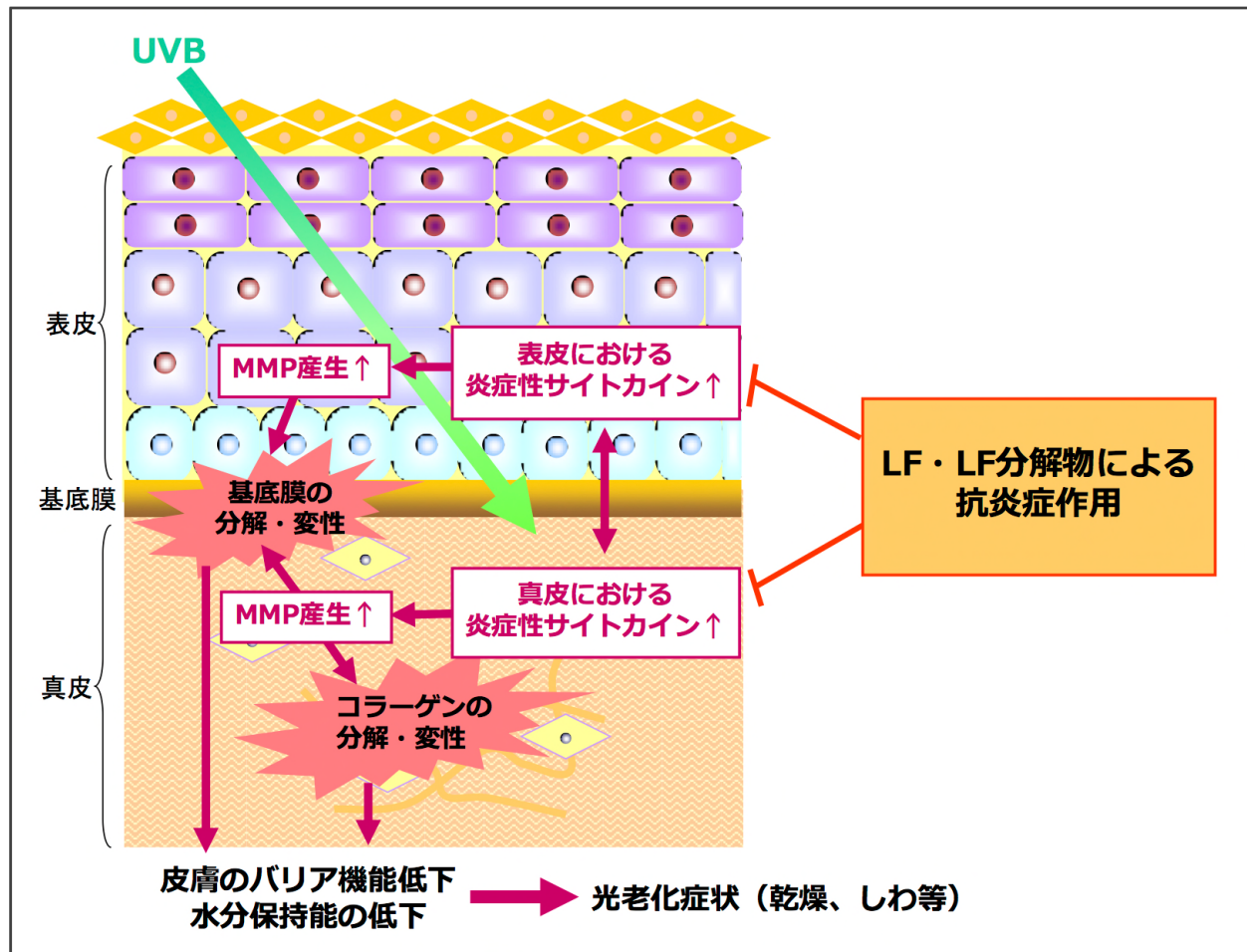


図3 LF・LF分解物による皮膚状態改善の作用機序

謝辞

本研究は、東京農工大学農学部との共同研究として実施し、野村義宏先生のご指導を賜りました。ここに深く感謝の意を表します。

参考文献

- 1) Shimmura, S., *et al.*, Exp Eye Res 63(5):519-526, 1996.
- 2) Ogasawara, Y., *et al.*, Int J Mol Sci 15(1): 1003-1013, 2014.
- 3) Tang, L., *et al.*, Wound Repair Regen 18(1): 123-131, 2010.
- 4) Tang, L., *et al.*, Br J Dermatol 163(1):38-47, 2010.
- 5) Saito, S., *et al.*, Biotechnol Lett 33(1):33-39, 2011.
- 6) Murata, M., *et al.*, J Dairy Sci 97(2):651-658, 2014.

高コレステロール血症・動脈硬化症 モデルに対する腸溶ラクトフェリンの有用性

中村 佳菜恵

Kanae NAKAMURA

ライオン株式会社

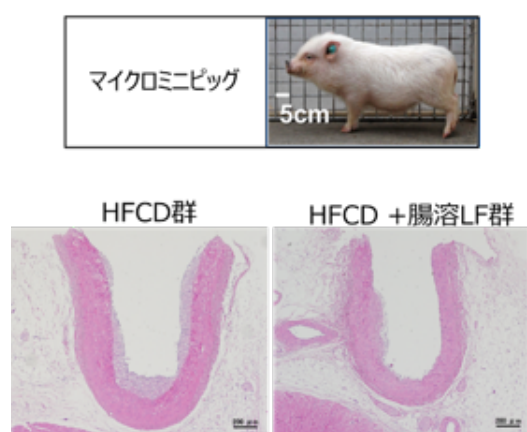
生命科学研究所

1.メタボリックシンドロームと動脈硬化症 について

メタボリックシンドロームは、内臓脂肪型肥満に加え、高血糖、高血圧、脂質異常のうち2つ以上を合併した状態を指す。メタボリックシンドロームは動脈硬化症の発症リスクを高めること、動脈硬化症は心疾患や脳血管疾患などの重篤な疾患を引き起こすことが知られており、メタボリックシンドローム及び動脈硬化症の予防は、日本医療における重要な課題であると言える。

2.腸溶ラクトフェリンの高コレステロール 血症・動脈硬化症予防作用

我々はこれまでに肥満傾向の健康な日本人男女26人を対象として、二重盲検群間比較試験を実施し、腸溶ラクトフェリン(LF)が内臓脂肪を有意に低減させることを明らかにしている。そこで我々は、LFが動脈硬化症に対しても抑制作用を示すと予想し、鹿児島大学の川口准教授らがマイクロミニピッグを用いて確立した、食餌誘導性動脈硬化症モデルにて、腸溶LFの有効性を評価した。



Group: Animal No.:	コントロール			HFCD			HFCD+腸溶LF		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
左冠動脈前下行枝	—	—	—	II	II	II	—	I	—
右冠動脈	—	—	—	II	II	II	—	I	—
肺動脈	—	—	—	I	I	I	—	—	—
大動脈弓	—	—	—	II	II	II	—	—	—
総頸動脈	—	—	—	I	—	—	—	—	—
胸大動脈	—	—	—	II	I	II	—	—	—
腹大動脈	—	—	—	II	II	II	—	—	—
外腸骨動脈	—	—	—	II	II	I	—	—	—
内腸骨動脈	—	—	—	—	II	—	—	I	—
腎動脈	—	—	—	II	II	—	—	—	—
脾動脈	—	—	—	—	—	—	—	—	—
上大脳動脈	—	—	—	I	—	—	—	—	—
内頸動脈	—	—	—	—	—	—	—	—	—
後交通動脈	—	—	—	II	—	—	—	—	—
脳底動脈	—	—	—	—	—	—	—	—	—

—：動脈硬化層の形成は認められない

I：動脈内膜において泡沫化マクロファージが認められる

II：動脈内膜において層状の泡沫細胞が認められる

図1. マイクロミニピッグの動脈の組織学的解析結果

(左) 右冠状動脈の組織学的解析結果

(右) 組織学的解析結果に基づき分類した、各動脈における動脈硬化度

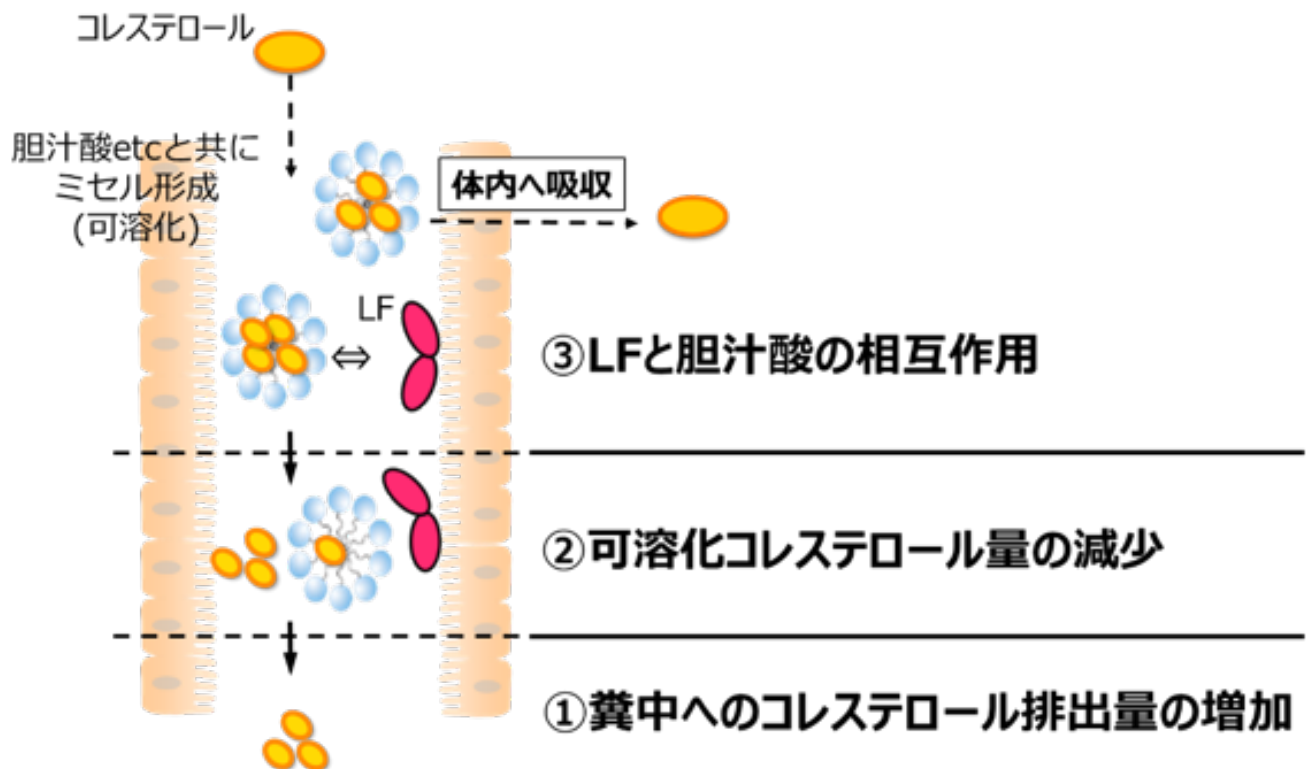


図2.LFのコレステロール吸収抑制作用仮説

マイクロミニピッグに、高脂肪高コレステロール餌 (HFCD) 及び腸溶LF (LFとして500 mg/body/day) を8週間投与したところ、HFCD投与により上昇した血清総コレステロール及びLDLコレステロール濃度が、有意に低下した。一方、HDLコレステロールに関しては、腸溶LF投与による低下は認められなかった。また、15の動脈を組織学的に解析したところ、HFCD投与により複数の動脈に動脈硬化層が形成されたのに対し、腸溶LFを投与すると動脈硬化層の形成が抑制されることが示された(図1)。

これらの結果より、腸溶LFは、高コレステロール血症及び動脈硬化症に対して予防効果を発揮することが示された。

3.ラクトフェリンのコレステロール吸収抑制作用

食物から摂取されたコレステロールは、小腸に到達後、胆汁酸等が構成するミセルに溶け込み、体内へと吸収される。塩基性蛋白質であるLFは、小腸内ではプラスに帯電する為、マイナスに帯電する胆汁酸と小腸内で相互作用すると推察される。我々は、この相互作用により、コレステロールのミセルへの可溶化が阻害され、小腸におけるコレステロール吸収が抑制され则认为した。そこで、本仮説を検証するために、以下の3つの検討を実施した(図2)。

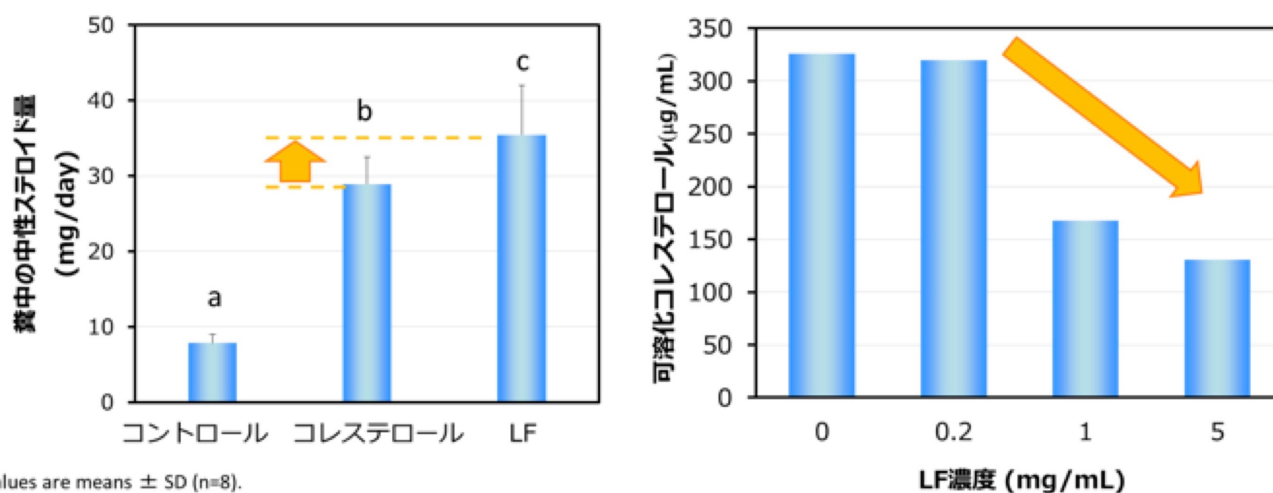


図3.LFのコレステロール吸収抑制作用仮説の検証結果

(左) ラットにおけるLFのコレステロール排出促進効果

(右)モデル小腸内溶液におけるLFのコレステロール不溶化作用

①LFによる糞中へのコレステロール排出量の増加

高コレステロール負荷ラットに対してLFを3週間混餌投与し、最後の二日間の糞を回収した。摂取したコレステロールの一部は、腸内細菌によってコプロスタノールへと代謝されることから、コレステロール排出促進の指標として、コレステロールとコプロスタノールを合算した中性ステロイドを測定した。その結果、LF投与による、糞中への中性ステロイド排出量の有意な増加が認められた(図3.左)。

②モデル小腸内溶液における可溶化コレステロール量の減少

高コレステロール負荷ラットの腸内脂質組成を解析し、その組成を基にモデル小腸内溶液を作製した。この溶液にLFを添加したところ、LF濃度依存的に可溶化コレステロール量が減少した(図3.右)。

③LFと胆汁酸の相互作用

等温滴定型熱量測定より、LF溶液に対する胆汁酸溶液の滴下による吸熱ピークが観測され、LFと胆汁酸

の相互作用が確認された。さらに、小角X線散乱法を用いた解析から、LF添加によって、モデル小腸内溶液中のミセルサイズが増大すると共にミセル形状が球状から楕円状に変化することを確認した。我々は、これらの変化が、LFのコレステロール吸収抑制作用に関与しているのではないかと推察している。

以上の検討より、LFのコレステロール吸収抑制作用は、LFの高コレステロール血症及び動脈硬化症予防作用に寄与していることが示唆された。

謝辞

本研究は、鹿児島大学 谷本昭英教授、鹿児島大学 川口博明准教授、東京大学 加藤久典特任教授、東北大学 池田郁男教授、京都府立医科大学 西野輔翼特任教授のご指導を賜りました。ここに深く感謝の意を表します。

第12回国際ラクトフェリン会議

優秀演題賞のご案内

本年11月に、第12回国際ラクトフェリン会議が名古屋市のウェスティンナゴヤキャッスルで開催されます。国内外のラクトフェリン研究者が一同に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。

なお、2015年11月2日現在で35歳以下の学部学生、大学院生(修士課程及び博士課程在籍者)および博士研究員(postdoctoral fellow)を選考対象とした**優秀演題賞**を国内外から最大10名まで選考のうえ授与します。副賞は、65,000円の宿泊費(ビジネスホテル5泊相当額)とGala Dinnerの招待券です。

優秀演題賞の申請には、年齢を証明する学生証のコピー(pdf)(または在籍証明書)および英文による指導者の推薦状(発表内容要旨と申請者の貢献を明記、300語程度)を津田洋幸学会長(htsuda@phar.nagoya-cu.ac.jp)にメールで提出してください。締め切りは2015年8月30日です。

国際ラクトフェリン会議ホームページ(和文)

<http://plaza.umin.ac.jp/~lactoferin12/awards.html>

事務局

名古屋市立大学 津田特任教授研究室

〒467-8603 名古屋市瑞穂区田辺通3-1

TEL / FAX : 052-836-3497

第12回国際ラクトフェリン会議 運営事務局

株式会社JTB中部 GLOBAL MICE事業部

コンベンションデスク内

〒460-0002 名古屋市中区丸の内1-17-19

キリックス丸の内ビル7F

TEL : 052-211-6733 FAX : 052-231-1322

日本ラクトフェリン 学会ニュースレター

第14号 (2015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

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