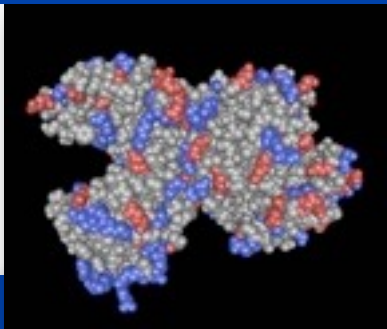


Lactoferrin NEWS

日本ラクトフェリン学会ニュースレター 第15号

2015年11月



巻頭言

医薬品としてのラクトフェリンへの想い

佐藤 淳
Atsushi SATO

東京工科大学 応用生物学部

1. 巻頭言

医薬品としてのラクトフェリンへの
想い 佐藤 淳

2. ラクトフェリンセミナープロシー ディング<後半>

◆ 歯科疾患に対するラクトフェリン
の臨床的効果を検証する 玉
置幸道

◆ ラクトフェリンと動物の病気 佐
藤れえ子

3. テクニカルノート

3Dプリンターによるウシラクトフェ
リンN-ローブとC-ローブモデルの
作製 島崎敬一・相沢智康

理化学研究所から現在所属する東京工科大学へ移った頃、今まで気になっていたラクトフェリン(LF)の創薬化を研究テーマとして選ぶことを漠然と決めていた。実に12年前のことである。私とLFとの出会いは、さらにその約8年前に遡る。当時、企業の研究所でC型肝炎ウイルス(HCV)の診断薬開発に従事していた私は、LFというミルク由来のタンパク質が、HCVのエンベロープに結合するという報告を学会要旨集に見つけた。その時はこのタンパク質の機能を全く知らなかったし、特段の興味もわかなかった。ラクトという接頭語から連想されるミルクという単語だけが記憶に残った。大学に移り、研究テーマに頭を悩ましていた頃、不思議にもこのミルクという単語が頭をよぎった。まさにLFの化学(PEG)修飾による安定化を研究しようと思った時だった。その年、第1回LFフォーラムが東京、品川で開催された。人生には不思議な縁があるもので、そのフォーラムには、以前の企業でお世話になった清水洋彦氏が(株)NRLファーマ所属として参加されていた。偶然にもLFのPEG修飾を研究する研究者を捜しており、既にPEG修飾で高名な先生に話をしたが、断られたとのことであった。共同研究がすぐに始まった。

幸いにも、PEG修飾LFは順調に開発することができ、さらに注射剤を狙って、遺伝子組換え型ヒトLF/ヒトIgG Fc融合タンパク質を開発することができた。医薬品としてのLFを世に出せると喜んだが、現実は甘くなかった。

いろいろな製薬企業の関係者にLFを説明したが、LFとは、薬効機序のはっきりしない健康食品のような扱いを受けているという現状がわかってきた。免疫に関連する生物製剤の開発を経験された専門家でもそうなので、多くの方は推して知るべしである。医薬品化を進める為には、LFの優れた機能をきちんと科学的に説明する必要があり、それは我々LF研究者の責務であると強く感じている。私がLFの存在を意識するきっかけとなったHCV診断薬は、当時、厚生省の製造承認を受けることができたにもかかわらず、企業の診断薬事業からの撤退により上市は実現できなかった。医薬品としてのLFへの夢を実現するためには、地道な努力が必要であると痛感している今日この頃、その覚悟はとうにできている。

歯科疾患に対するラクトフェリンの 臨床的効果を検証する

玉置幸道

Yukimichi TAMAKI

朝日大学歯学部口腔機能修復学講座

歯科理工学分野

ラクトフェリンは免疫賦活作用、抗炎症作用(血管新生の阻害)、鎮痛作用(μ オピオイドの増強)、抗菌活性(異物認識の強化)等の多種多様な機能を有することは広く知られている。演者らは2005年に歯科ラクトフェリン研究会(その後、名称を臨床ラクトフェリン研究会に変更)を立ち上げてその臨床試用を経口摂取および直接貼付を行い検討した結果、長期にわたり悩まされていた慢性で重篤な症状が好転したという報告を多数受け、その効果に興味を抱いた。

本講演では研究会の活動として行ってきたラクトフェリン摂取による口臭、口内炎、歯周疾患に対する改善効果を報告する。

口臭に対する効果

被験者は12名(男2名、女10名)で、年齢は32~77歳である。腸溶性ラクトフェリン(Lactoferrin D:1cap内に100mgラクトフェリン含有、NRLファーマ社製)を、300mg/day摂取し、起床時より絶食、口腔内非清掃の状態、毎週同時間に来院し、口臭および口腔内の診査を行った。口臭については、簡易ガスクロマトグラフィー方式のオーラルクロマ(アビリット社製)を用い、硫化水素、メチルメルカプタン、ジメチルサルファイドの濃度測定を行った。併せて舌背表面の色調変化も写真記録した。結果を以下に示す。

1. 硫化水素は約91.7%が減少、喫煙者一人のみ上昇。
平均減少量は4.28(ng/10ml)、喫煙者は1.02(ng/10ml)であった。
2. メチルメルカプタンは9名中3名が上昇したが総じて減少傾向が見られた。非喫煙者の平均減少量が

8.82(ng/10ml)、喫煙者は0.58 (ng/10ml)の減少であった。

3. $\text{CH}_3\text{SH}/\text{H}_2\text{S}$ も約55.6%が減少。非喫煙者の平均減少量は0.25、喫煙者は0.41上昇した。この結果は上記ガスと同様の傾向を示したが、非喫煙者の6名のうち半数がわずかながら上昇しており、今後の更なる検討の必要がある。
4. 一人の治験者の舌表面を観察した結果、ラクトフェリン服用前に比べ、服用後は舌苔が薄くなる傾向を認めた。舌尖や舌縁部にはそれほど違いは無いが、口臭の原因に大きく関与している舌背後方部において舌正中溝が少しずつ露頭しているのを認めた。

口内炎への効果

口腔内に存在するラクトフェリン受容体に直接作用させるために腸溶性皮膜を施さないラクトフェリン口腔内貼付錠(ラクパッチ: 1錠内30mgラクトフェリン含有、NRL

ファーマ社製)を適用した。ラクパッチを口内炎、義歯性潰瘍といった口腔粘膜創傷部位に直接貼付し疼痛消失までの時間、治癒過程を観察した。直接貼付が困難であった部位は、ラクパッチをすり鉢等で粉末状にして疼痛部位に貼付し、同様に疼痛消失までの時間、治癒経過を観察した。結果は以下の通りであった。

1. 口内炎、義歯性潰瘍といった口腔粘膜損傷部位にラクパッチを貼付したところ、1例のみ効果が認められなかったが、その他の症例において時間の差は認められたが強い鎮痛効果を示した。
2. 抜歯窩に直接、粉碎ラクパッチ粉末を挿入した症例では挿入後、10～30分で疼痛は消失し、創傷治癒を妨げる事はなかった。
3. また、治癒経過の観察により消炎作用、組織治癒促進作用等も認められ、ステロイド製剤と比較し創傷治癒促進作用が認められた。

歯周疾患に対する効果

6mm以上の歯周ポケットがある患者に限定して、その中で4mm以上のポケットがある歯にラクパッチを破碎し歯周ポケット内に不定形顆粒の状態に挿入した。評価は歯周ポケットの深さ計測と、計測時のプロービングによる出血(BOP)の有無で行い、検討を始める前と以降での状態について、改善、不変、悪化の三段階で示した。結果を下表に示す。

計測結果				
測定項目	対象歯	改善	不変	悪化
ポケット	240	90	140	10
BOP	132	71	61	0

今回のラクトフェリンを用いた新しい治療法を従来の標準法と比較すると、少なくとも同等か、あるいはそれ以上の治療効果が得られることが明らかになった。このことからラクトフェリンの歯周ポケット局所への適用は、新しい治療法になりうると考えられた。

まとめ

ラクトフェリンの生体防御機能が優れていることは間違いなく、歯科領域でも難治疾患への適用が期待される。特に人体にもともと存在している蛋白質であるから、副作用やアレルギーもほとんど懸念されないことは大きな魅力である。なお、歯科疾患とラクトフェリンとのかかわりについては、2007年度の日本歯科評論に総説が通年にわたり連載された¹⁻¹²⁾ので参考にされたい。

参考文献

1. ラクトフェリン物語-1.ラクトフェリンの歯科領域における臨床応用.日本歯科評論771号,2007
2. ラクトフェリン物語-2.ラクトフェリンとは何か?日本歯科評論772号,2007
3. ラクトフェリン物語-3.口内炎、口角炎へのラクトフェリン応用.日本歯科評論773号,2007
4. ラクトフェリン物語-4.ラクトフェリンの口臭抑制効果.日本歯科評論774号,2007
5. ラクトフェリン物語-5.第1回歯科ラクトフェリンシンポジウムが有意義に開催.日本歯科評論775号,2007
6. ラクトフェリン物語-6.ラクトフェリンによる歯周病へのアプローチ.日本歯科評論776号,2007
7. ラクトフェリン物語-7.舌痛症にラクトフェリン.日本歯科評論777号,2007
8. ラクトフェリン物語-8.バイオフィルムとラクトフェリン.日本歯科評論778号,2007
9. ラクトフェリン物語-9.ラクトフェリンとドライマウス.日本歯科評論779号,2007
10. ラクトフェリン物語-10.歯周疾患へのラクトフェリンの応用.日本歯科評論780号,2007
11. ラクトフェリン物語-11.ラクトフェリンはう蝕を予防するだろうか?日本歯科評論781号,2007
12. ラクトフェリン物語-12.第8回国際ラクトフェリン会議より.日本歯科評論782号,2007

ラクトフェリンと動物の病気

The Clinical Effects of Lactoferrin on Animal Diseases

佐藤 れえ子

Reeko SATO

岩手大学

小動物病態内科学研究室

ウシラクトフェリン(bLF)は牛乳より分離される鉄結合性糖タンパクであり、抗菌・抗ウイルス・抗原虫効果ならびに抗炎症作用や免疫調節作用など幅広い生物学的活性が報告されている。さらに、直接的な抗腫瘍作用や腫瘍免疫誘導などによる抗腫瘍効果も期待されることから、生体応答調節剤(biological response modifier ; BRM)として利用されている。これらのbLFの有効作用は、人で試される前に、動物の様々な病態において経口投与することで検討されてきた。以下に、私達の研究室でこれまで検討してきた動物の各種病態に対するbLFの効果についてお示しする。

1.口内炎とラクトフェリン

bLFの口腔内への投与は、口内炎や歯肉炎・歯周病などに有効であることが明らかになっているが、実はこの抗炎症効果が初めて示されたのは、ネコのAIDSにおける難治性口内炎への臨床応用が最初である。AIDS期のネコは極めて直りにくい慢性の口内炎を示すことが多いが、完治は見込めず疼痛のために摂食障害となる。bLF

の口腔内への投与は、ネコの疼痛を和らげ好中球機能を調節することによって「抗炎症作用」をもたらし、ネコの食欲を回復させた。このような効果は、ネコカリシウイルス感染症(ネコ風邪)の舌炎や、尿毒症の口内炎などにも有効であった(図1)。



＜bLF投与前＞



＜bLF投与後＞

図1. 口内炎のネコにbLFの経口投与を実施。投与後疼痛の緩和に伴い、舌を動かすことが可能になり、身繕いが再開されて口の周りの汚れは取れている。流涎も止まった。

このような臨床効果のメカニズムを追求するために、bLF経口投与がネコの好中球機能に及ぼす影響を検索したところ、好中球貪食能はbLF投与後有意に増加する一方で、炎症の際に活性化される好中球の接着能は有意に抑制されることが明らかとなった(Sato, R.ら, Am. J. Vet. Res. 57, 1996)。グルココルチコイドなどの抗炎症薬の示す効果は、この好中球接着能を強く抑制することによって発現するとされている。bLFは細菌などに対する貪食作用を維持しながらも、接着能を強く抑制することによって、口内炎のネコに臨床症状の改善をもたらしたと考えられた。また、bLFは好中球の補体レセプター発現を抑制することも明らかとなり、過度の炎症を緩和する方向で働くことが示された。したがって、bLFは、免疫力の低下するAIDS期の慢性炎症に対しては理想的なBRMであるといえる。

2. 先天性好中球機能異常症とラクトフェリン

このようなbLFの好中球機能に対する調節作用は、生まれながらに好中球の機能異常があるために細菌感染をくりかえす先天性好中球機能異常症の症例に対して、強力な治療効果をもたらした。先天性の好中球機能異常症の1つに、白血球粘着不全症(LAD)があり、好中球の β_2 インテグリン発現が強く抑制されている。イヌの場合はCLADと呼ばれている。CLADバリエーションのイヌに対してbLFの経口投与を継続したところ、細菌性鼻炎・ぶどう膜炎・細菌性肺炎の重度な症状が改善され、この時好中球の β_2 インテグリン発現が増強されることが明らかとなった(図2、CD18mRNA発現の増加を示す)。bLFは牛乳アレルギーのない人や動物であれば、食品の1つとして連日長期間摂取することが可能なことから、先天的な欠陥を抱える好中球異常症の症例には生涯継続可能と思われる(Kobayashi, S.ら, Vet. Immun. Immunopathol., 130, 2009, Sato, R.ら, J. Vet. Med. Sci. 79, 2012)。

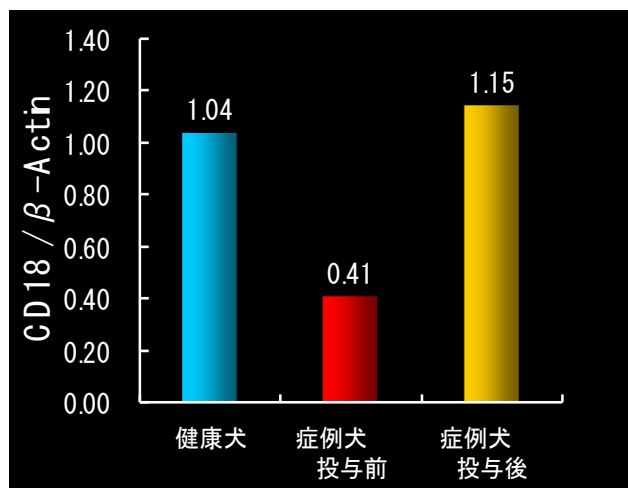


図2. bLF投与前後のPCRによる好中球CD18mRNA発現の変動。

投与後に健康犬と同レベルに発現が増加。

3. 腫瘍とラクトフェリン

bLFは腫瘍細胞に対して増殖を抑制することや、固形癌に直接注射すると癌が縮小することが、実験動物への投与で明らかになっている。動物の各種腫瘍細胞(イヌ乳腺腫瘍細胞・イヌ扁平上皮癌細胞・イヌ肝細胞癌細胞)に直接bLFを添加培養して細胞増殖に及ぼす影響を観察したところ、bLFの添加は直接これらの癌細胞の増殖を明らかに抑制し、その機序は、癌細胞の細胞周期G1期停止誘導およびアポトーシス誘導が関与していることが明らかとなった。

また、マウス直腸腺癌細胞をマウスに移植し、bLFを腫瘍に直接注射して移植癌の体積変動を観察した結果、bLFの直接局所接種により癌細胞の体積は抑制する傾向を示し、移植腫瘍組織内のcyclin D1発現が抑制されていたことから、bLFの直接の接種によっても腫瘍細胞のG1アレストが誘導されることが明らかとなった(Yamada, Y.ら, J. Vet. Med. Sci. 70, 2008)。このようにラクトフェリンは抗腫瘍効果という点からも注目されるタンパクであり、癌治療の補助的な支持療法として応用できる可能性があると思われる。

3Dプリンターによるウシラクトフェリン N-ローブとC-ローブモデルの作製（その1）

島崎 敬一

Keiichi SHIMAZAKI
藤女子大学

相沢 智康

Tomoyasu AIZAWA
北海道大学 先端生命科学研究院

1.はじめに

タンパク質分子の立体構造をコンピューターで見るのは今では普通の光景ですが、初めてX線結晶構造解析によって立体構造が決定されたのは1950年代の後半でした。J.Kendrewによるミオグロビン(1)とM.Pertzによるヘモグロビン(2)が最初の報告です。J.Kendrewが解析対象としたマッコウクジラミオグロビン(sperm whale myoglobin)は153残基からなるヘムタンパク質です。Protein Data Bank Japan(PDBj)の「今月の分子」のトップで取り上げられており、分かり易い文章で解説されています。また、M.Pertzが解析したのはウマヘモグロビンで、2人そろって1962年のノーベル化学賞を受賞しました。これらに続いて酵素分子としては初めてのトリゾチームの立体構造がD.C.Phillipsらのグループによって報告されました(3)。その後数多くのタンパク質の構造解析が行われるようになり、最近は大規模放射光施設(SPring-8)によるタンパク質の構造解析プロジェクト(4)が知られています。

ミオグロビンの最初のX線結晶解析の解像度は6Åで、次いで2Åのデータが発表されました。ミオグロビン分子を構成している規則構造のほとんど(79%)が α -ヘリックス構造をとっていますが、6Åの解像度では詳細を表示することは出来ず、2Åでの解析データを待ってヘリックス構造の詳細が明らかになりました。タンパク質は巨大分子ですから、分子モデルを樹脂あるいは金属の球と棒などで積み木やレゴのように組むのは非常に苦勞の多い作業だったと推察されます。その後しばらくして、コンピューターグラフィックスでタンパク質立体構造をディスプレイ上に表示できるようになり、昨今は非常に高機能でありながら無料で公開されているソフトウェアも多くなりました。このようにコンピュータ(in silico)での操作ではさまざまな表示方法が選択でき、かつ自由に回転させたり任意のアミノ酸残基を色で識別したり、原子間の距離や相互作用の表示、さらにはこれらの表現方法の自由な組み合わせなど非常に多岐にわたる表現が可能になっています。

Protein Data Bank Japan(PDBj)「今月の分子」サイトのアドレス

ミオグロビン <http://pd bj.org/mom/1>ヘモグロビン <http://pd bj.org/mom/41>リゾチーム <http://pd bj.org/mom/9>

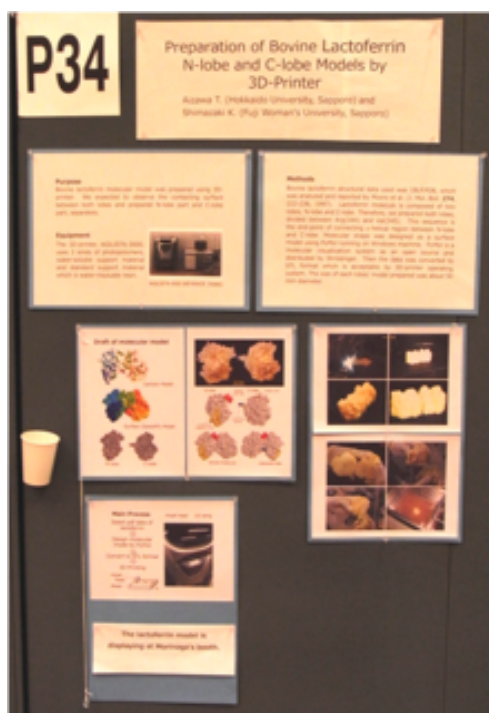


図1 第XII回ラクトフェリン国際会議で発表したポスターの様子

ほとんどのポスターがA0サイズの1枚ものだったので、A4サイズ主体のつたないポスターは異色だったようです。ポスター番号がとても目立っています。

ところでごく最近のことですが、あたかも印刷するように樹脂を積層しながら立体的な物体を作製するいわゆる三次元(3D)プリンターが出現し、その急速な発展によりさまざまな形態の構造物の作製が可能になってきました。もちろん、タンパク質の分子モデルを作製した例も見られます。そこでラクトフェリン分子のN-ローブとC-ローブの接触面がどのようになっているのか観察しようと考えて、ラクトフェリン分子を3Dプリンターで作製し、2015年11月に名古屋で開催された第XII回ラクトフェリン国際会議でポスター発表しました(図1)。本稿ではその内容について紹介し、続編でその背景を説明しようと考えております。

2. 3Dプリンター

用いた3DプリンターはAGILISTA-3000で、キーエンス(大阪)の製品です(図2)。このプリンターは光硬化性の2種類の樹脂を用いており、インクジェット方式によって

a



b

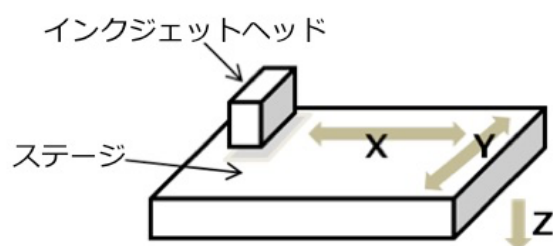


図2 AGILISTA-3000(a)とそのプリント原理(b)

積層してゆきます。用いる素材の一つは水溶性のポリマーを形成して構築物中の空間を埋めるために用いられ、もう一つは不溶性のポリマーで目的構築物の本体を構成するものです。プリント終了後に水溶性のポリマーを除くことにより目的物が得られることとなります。なお、このプリンターの仕様書(5)では2種類の樹脂をそれぞれサポート材、モデル材と書いております。丸みを帯びた装置なのでカタログ写真で見ると作業台の上に載るような形態に見えますが、高さが136 cmもあるかなり大きな装置です。サイズその他を仕様書から抜き書きしますと以下のようにになります。

造形サイズ	底面A4サイズ、高さ200 mm
解像度	635 × 400 dpi
外形寸法	W944 × D700 × H1360 mm
重量	188 kg

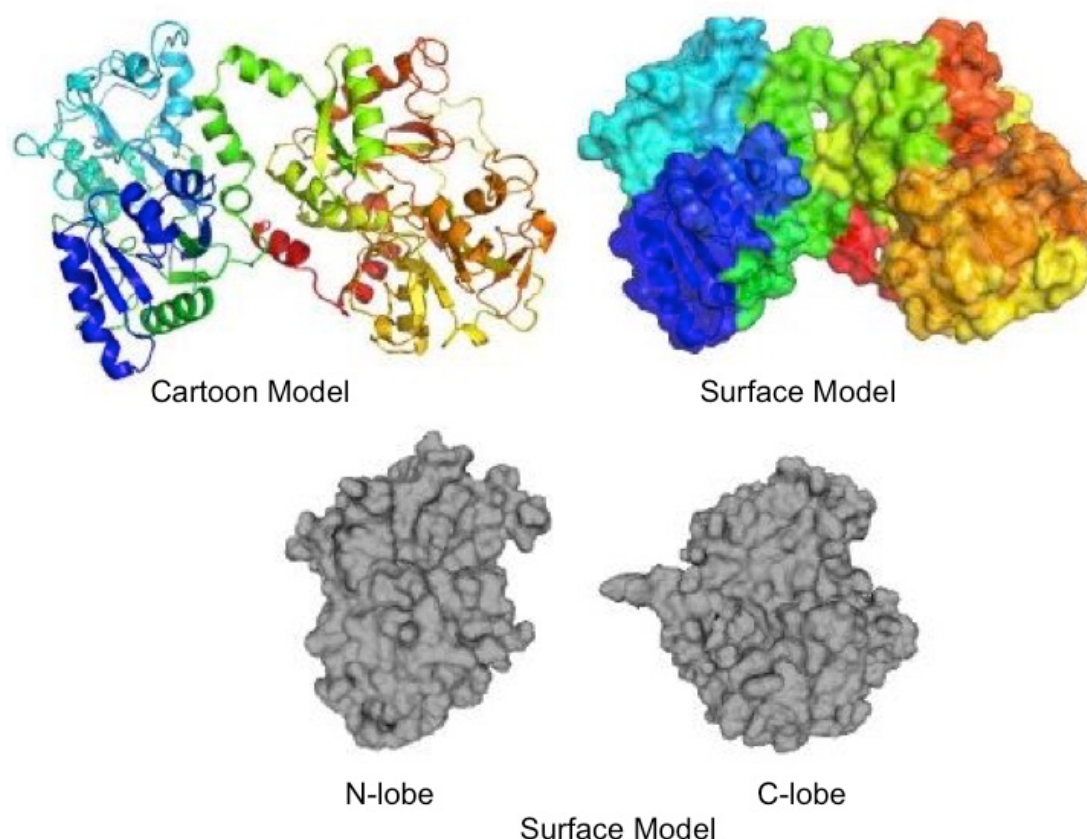


図3 作製に用いたウシラクトフェリンの立体構造モデル
モトーンで示した2つのローブを作製した。

3. ラクトフェリン立体構造データ

ウシラクトフェリンのX線結晶解析データ 1BLF.pdb(6)を用い、N-ローブからの344残基までと345残基以降のC-ローブの2つの部位に分離して作製することとしました。タンパク質分子の骨格構造を表示する方法は、 α -ヘリックスや β -構造などの二次構造を表現するには適した方法です。しかし、タンパク質ドメイン間の接触面の状態などを観察しようとする場合にはペプチド鎖だけが見える骨格構造表示ではなく、各アミノ酸残基の側鎖も表示され、かつ各原子の実際の表面のサイズで表示されるモデルを選択しなければなりません。そこで、分子構造表示ソフトのPyMol(7)を用いて図3に示したsurface modelで2つのローブを作ることとしました。

4. ラクトフェリン分子モデルの作製過程

PyMolで作成した分子モデルを3DプリンターAGILISTAで読み込めるデータ形式(STLフォーマット)に変換し、分子モデルの作製(造形ともプリントとも言うようです)を開始しました。このプリンターではまず最初に樹脂で台座を作り、その上に2種類の樹脂をインクジェットヘッドから吐出させ、次いで元の方にローラーを動かして表面を平滑化しながら紫外線を照射して硬化させます。同様な操作をZ軸方向にステージを移動させて樹脂を積層させてゆきます(図2)。サポート材とモデル材を用いる方式では、空間に浮かんだ形状のものも作製できるのがメリットですが、分子内部に外部と通じていない空間があればサポート材を取り出すことができなくなります。なお、N-ローブとC-ローブを並べて同時にプリントすることが可能でしたので、とても時間の節約になりました(図4)。

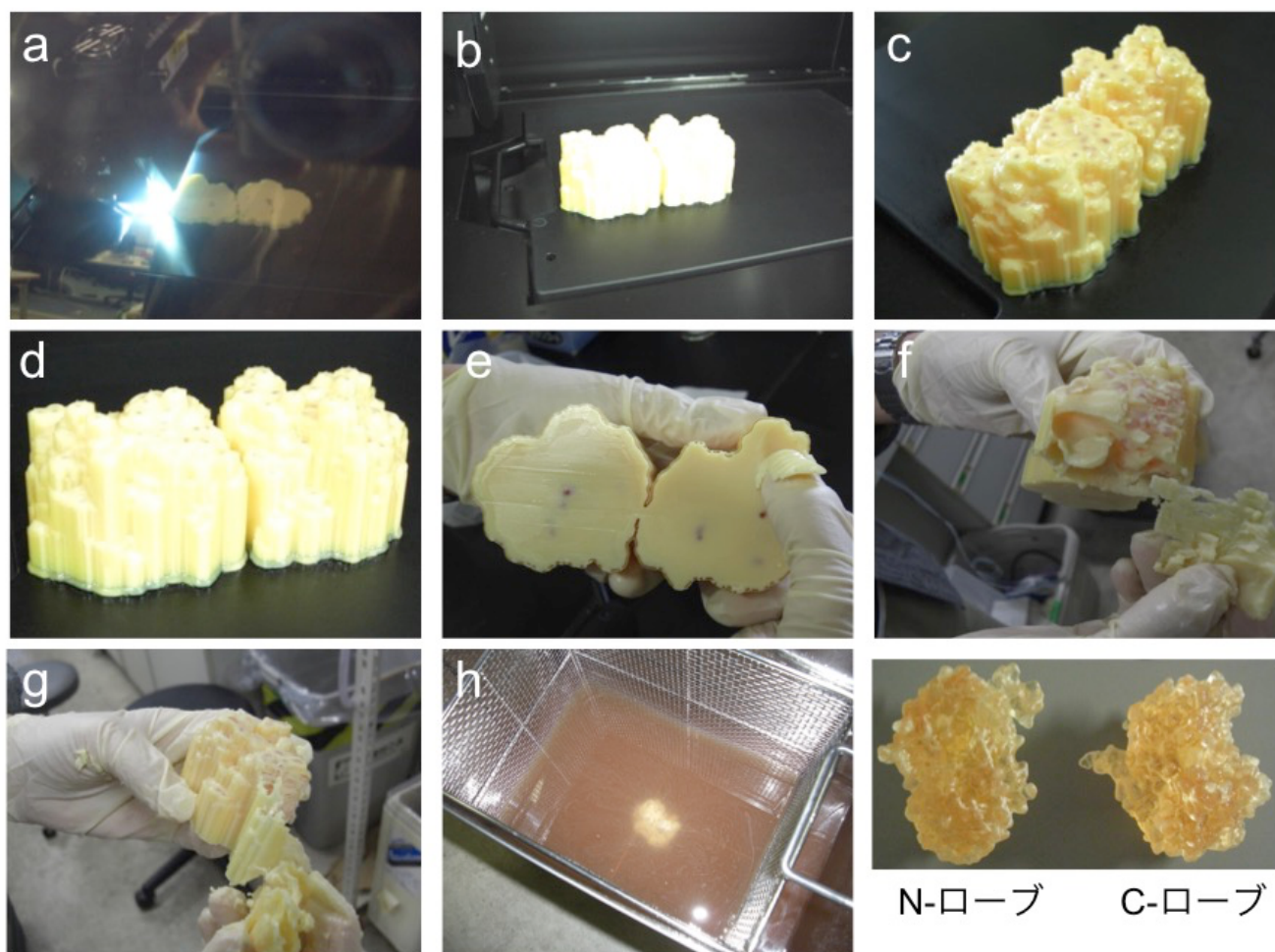


図4 3Dプリンターによるラクトフェリン分子モデルの作製過程(a~h)と完成したモデル

- a 最初にステージ上で台座を作製する。インクジェットヘッドから射出された樹脂を硬化させるためのレーザー光が見える。
- b-d 台座の上に載っている樹脂の積層・硬化が完了したN-ローブとC-ローブ。
- e 台座から外した2つのローブを底面から見たところ。支持用のポリマーは指でも外せる柔らかさ。
- f, g 2つのローブそれぞれの外側を被っている支持用の水溶性ポリマーを出来るだけ手で取り除く。
- h さらに洗浄液に浸して、細かな部分の水溶性ポリマーを溶解させて取り除く。

今回はラクトフェリン分子の作製に用いた3Dプリンターの仕様と、モデル完成までのプロセスについて簡単に紹介しました。次回ではラクトフェリン分子のモデルについての背景などについて説明する予定です。

参考文献・参考サイト

1. J.Kendrew et al., (1985) Nature, 181, 662-666.
2. M.Perutz, (1962) Nature, 194, 914-917.
3. D.C.Phillips, (1966) Sci. Am., 215, 78-90.
4. http://www.spring8.or.jp/ja/news_publications/research_highlights/no_05_2k/
5. http://www.keyence.co.jp/marketing/3d_printer/agilista_3000/agilista_3000
6. 6. Moore et al., (1997) J. Mol. Biol., 274, 222-236.
7. <http://www.pymol.org/>

第12回国際会議優秀学生賞

第12回国際ラクトフェリン会議が名古屋市のウェスチンナゴヤキャッスルで開催されました。国内外から160名以上のラクトフェリン研究者が一同に会し、活発な討論が行われました。国際会議の報告は次号に掲載しますが、速報としてGenevieve Spik賞および優秀学生賞を受賞された方々を以下にご紹介いたします。

Genevieve Spik賞

- **Nicholas Kane Hunter Ostan (Canada)** A new model for the interaction between lactoferrin binding protein B and lactoferrin.

Excellent Student Award(優秀学生賞)

- **Kayo Horie (Japan)** Effects of bovine lactoferrin on facial pathological pain following a trigeminal nerve injury.
- **Ryo Uchida (Japan)** Promoting effect of bovine lactoferrin on epithelial differentiation and barrier function of HaCaT human keratinocytes.
- **Jorge E. Valdez-Flores (Mexico)** Lactoferrin and LF-derived synthetic peptides decrease fimbrial gene expression and suppress the adherence of Enterococcal *Escherichia coli* to HEp-2 cells *in vitro*.
- **Uriel A. Angulo-Zamudio (Mexico)** Effect of lactoferrin and lactoferrin-derived synthetic peptides on *Streptococcus pneumoniae* biofilms and its impact in the Quorum Sensing System.
- **Lauren Roukia Brink (USA)** Regulation of iron metabolism and inflammation by supplemental lactoferrin (Lf) in pre-weanling lactoferrin receptor (Lfr) knockout mice.
- **Yuta Maekawa (Japan)** Effects of lactoferrin on blood glucose level and glucose absorption in the small intestine.
- **Nilisha Rastogi (India)** Structure of tryptically produced iron-free C-lobe of lactoferrin and its functional significance in the gut.
- **Yu Morita (Japan)** Effects of lactoferrin and lactoperoxidase-containing tablets on oral hygiene status.

日本ラクトフェリン 学会ニュースレター

第15号 (2015年11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