

総説

鉄結合性糖タンパク質ウシラクトフェリンの抗炎症作用とそのメカニズム

小林 沙織

要約

ラクトフェリンは鉄結合性糖タンパク質で、乳汁や唾液、涙液、鼻汁などの外分泌液中や成熟好中球の二次顆粒に存在し、局所の非特異的免疫に深く関与している。牛乳成分であるウシラクトフェリンの局所投与がネコの難治性口内炎に治療効果があることが明らかとなり、補助療法として臨床応用されている。本研究では、ウシラクトフェリンによる治療効果の機序を探るため、好中球およびリンパ球機能への影響を検討した。その結果、ウシラクトフェリンは、好中球の非特異的貪食能および殺菌能を保持させながら吸着能および補体レセプターCD35の発現を抑制した。また、リンパ球において、刺激によって誘導された炎症性サイトカインの発現を未刺激状態まで減少させた。このことから、ウシラクトフェリンは、好中球及びリンパ球に対して抗炎症効果を発揮することでネコにおける難治性口内炎の症状を緩和させていることが考えられた。さらに、ウシラクトフェリンが細胞外だけでなく細胞内へも作用している可能性が同時に示唆された。

キーワード：ウシラクトフェリン，難治性口内炎，FIV感染症，抗炎症作用

はじめに

ラクトフェリンは、生体内のさまざまな部分に広く分布する生体防御作用を示す分子量約80 kDaの糖タンパク質である。トランスフェリンファミリーに分類されるが鉄と結合しているため、サーモンピンクの色調を呈する（図1）。その生物学的活性は多様であり、抗菌・殺菌作用だけでなく、免疫調節作用や抗腫瘍作用などの多機能性を有することが数多く報告されている。抗腫瘍作用や抗炎症作用を期待して、牛乳中より分離精製したウシラクトフェリンやレコンビナントヒトラクトフェリンの臨床応用試験

が人医界では盛んに行われており、着々と臨床応用にむけて進められている。また、牛乳成分であることから、健康食品としても商品化されている。本稿では、ウシラクトフェリンの難治



図1 天然型ウシラクトフェリン

性口内炎に対する抗炎症効果およびそのメカニズムについて紹介する。

ラクトフェリンの生体内における分布

粘膜は常に外部環境に接触するため、その外分泌液はさまざまな抗菌タンパク質やペプチドをふくみ、生体防御機構の第一線で重要な役割を果たしている。その中に、ラクトフェリンは、なくてはならない物質として含まれている。このタンパク質は、初乳に高濃度に含まれ、また唾液、涙液、鼻汁などの外分泌液や成熟好中球の二次顆粒に存在する。大部分のラクトフェリンは腺上皮細胞表面に発現しており、そこから粘液へ分泌される。そして、リゾチームや分泌型IgAとともに、局所における感染防御因子のひとつとして働いている。また、ラクトフェリンは好中球内でも産生され、血中にあるラクトフェリンは好中球由来だとされている。そして、炎症が起こったときには、ラクトフェリンは外分泌液中で著しく増加する。同時に、活性化した好中球は炎症部位へ素早く移動し、高濃度のラクトフェリンを放出する [14]。ラクトフェリンには、きわめて強い鉄イオンのキレート作用があり、細菌の増殖に必要な鉄を奪うことによって静菌作用を示す一方、直接細菌の細胞壁を傷害することによって殺菌作用も示す [6, 13]。また、抗菌作用のみならず、炎症や免疫細胞の分化や増殖の調節作用を有することも明らかとなっている。このようにしてラクトフェリンは、局所において抗菌および免疫調節作用を発揮することで感染防御機構の非特異的免疫の活性化に重要な働きをしていると考えられている。

ウシラクトフェリンによるネコの 難治性口内炎の治療効果

小動物臨床の現場では、ネコの口内炎を治療することが比較的多い。しばしば口臭や流涎をともなって慢性化し、罹患ネコは痛みのため食

欲不振となって体重減少や体力の著しい消耗を招く。その原因には、機械的刺激、栄養状態、細菌およびウイルス感染などが考えられるが複合している場合も多く、特定することは容易ではない。一般に口腔内の炎症の進行とともに、細菌の二次感染が認められるようになり、さらに症状を悪化させる結果となっている。また、舌や歯肉に水疱や潰瘍を形成するネコカリシウイルスが口内炎の病変から分離されることも多く、再発を繰り返す口内炎の重要な原因として考えられている。さらに、免疫を抑制する疾患も慢性口内炎を引き起こすことがよく知られている。ネコ白血病ウイルス感染症やネコ免疫不全ウイルス (FIV) 感染症に罹患した多くのネコで重度の難治性口内炎がみられるのは、免疫力の低下による歯肉ポケットの細菌の増殖やカリシウイルスの持続感染が原因の一部と考えられている。

一方、前述のように唾液にはラクトフェリンが10-50 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で含まれており、IgAやリゾチームなどとともに口腔内の感染防御に関与している [12]。免疫能の低下するHIV患者では、口腔内カンジダ症に罹患すると初期では唾液中のラクトフェリンが著しく増加しカンジダの増殖を抑制する [1]。しかし、慢性化している病変では、唾液腺によるラクトフェリンの分泌機能不全が生じ、ラクトフェリン濃度が減少する結果、再びカンジダが増殖する [18]。液性免疫機能が減弱しているHIV患者にとっては、局所における非特異的免疫は二次感染を防ぐ上で必要不可欠なもので、唾液中のラクトフェリンの存在はその意味でも興味深い。

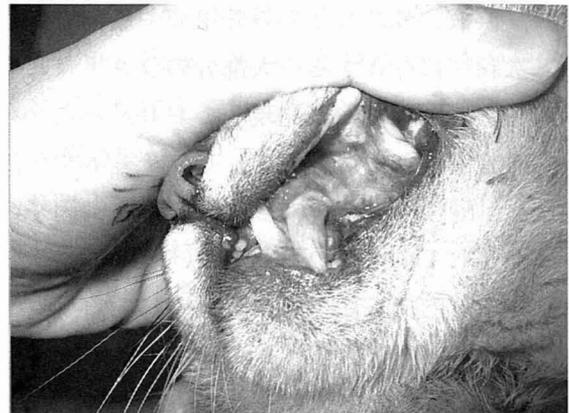
HIVと近縁のFIVの感染症でも、前述した通り、その臨床ステージが進行するにつれ、難治性口内炎が多くみられる。難治性口内炎では、ステロイドおよび抗生物質の投与により一時的に口腔内の炎症と症状を緩和させる対症療法が広く行われている。免疫抑制が進んだ症例では、それらの薬剤を長期投与せざるを得ないのが現

状であるが、免疫抑制、肝機能への影響や菌交代現象などの副作用の問題から常時使用しているわけにはいかない。Sato et al. [16] の研究により、ウシラクトフェリンの局所投与はFIV感染ネコにおける難治性口内炎を改善することが報告されているが、追実験を実施し、口内炎を呈するネコに対するウシラクトフェリンの経口投与の治療効果を検討した。臨床症状の改善の程度を、口腔内炎症の肉眼的変化、流涎の消失、疼痛反応、食欲の出現の項目をSato et al.

[16] の判断基準にしたがってウシラクトフェリンの投与前後を評価した。牛乳由来の天然型ウシラクトフェリン（森永乳業）を1日当たり40mg/kgを少量の水に溶いて1日1回経口投与した。投与期間は7-14日間とした。ラクトフェリン投与期間中に抗生剤やステロイドの投与はしなかった。その結果、口内炎症例7例のうち全例で1項目以上の臨床症状の改善効果が認められた（表1，図2）。すなわち、難治性口内炎を有するAIDS関連症候群（ARC）期および



投与前



投与後

図2 難治性口内炎へのウシラクトフェリンの臨床効果

左が投与前、右が投与7日後を示す。投与前は著しい流涎および中程度の疼痛がみられたが、投与により流涎および疼痛は消失した（供試ネコNo7）。

表1 難治性口内炎ネコに対するウシラクトフェリンの臨床効果

供試 ネコ No	FIV 病期	性別	年齢	口腔内炎症		流涎		疼痛		採食量		
				投与前	投与後	投与前	投与後	投与前	投与後	投与前	投与後	
1	—	猫ウイルス性鼻気管炎 中等度歯肉炎	CM	1	2	2	1	1	2	1	1	1
2	—	急性腎不全 重度口内炎	M	3	1	1	4	2	4	3	3	2
3	ARC	中等度口内炎	F	11	3	1	2	1	2	1	1	1
4	ARC	中等度口内炎	F	12	3	3	3	1	3	2	2	1
5	ARC	重度口内炎	M	10	4	4	3	3	4	3	4	4
6	ARC	軽度口内炎	M	12	2	2	1	1	2	1	2	1
7	AIDS	中等度口内炎	M	13	3	3	3	1	3	1	3	2

スコア：口腔内炎症，流涎，疼痛；4は重度，3は中程度，2は軽度，1は無症状。

採食量；4は食欲廃絶，3は通常の1/3程度，2は1/2程度，1は正常。

F：雌，M：雄，CM：去勢雄

難治性口内炎症例に対し，天然型ウシラクトフェリン40mg/kgを少量の水に溶かし7日間連続経口投与した。

AIDS期のFIV陽性ネコでは、7日間のウシラクトフェリンの経口投与によって5頭中4頭が流涎、疼痛反応および食欲不振の症状が改善した。流涎の消失がすぐみられ、続いて疼痛反応の消失および食欲の回復が投与7日以内に観察された。さらに、AIDS期のFIV陽性ネコへの37日間の長期投与試験でも、ARC期と同様に改善効果を早期のうちに示した(図2)。また、長期に投与することによって、変化しにくい口腔内の肉眼的炎症の緩和も次第に認められたため、口腔内の肉眼的炎症の改善は、他の項目に比較して、より投与の時間を要することが示された。また、急性腎不全と猫ウイルス性鼻気管炎による口内炎を呈したFIV陰性ネコでもウシラクトフェリン投与によって、口腔内の疼痛および流涎の改善が観察された。したがって、ウシラクトフェリンは軽度から中等度の口腔内炎症に対して広く改善効果があることが示された。

ウシラクトフェリンが好中球機能に及ぼす影響

ウシラクトフェリンは口内炎に対して治療効果を示したが、生体内ではどのような変化が起きているのであろうか。重症かつ慢性的な歯肉炎や口内炎がみられる病態として、好中球機能が破綻した慢性肉芽腫症や白血球粘着不全症およびリンパ球機能不全となった免疫不全症候群や重症複合免疫不全症があげられる[5, 9]。いずれの疾患も口腔内のみならず全身性に細菌、真菌やウイルスの重症感染を繰り返す。これらの報告からも、炎症および感染に対する好中球機能およびリンパ球機能の重要性が裏付けられるであろう。

初めに著者はウシラクトフェリンと好中球機能の関係について注目した。好中球は生体内に病原微生物が侵入した時に、直ちに血管上皮細胞をすり抜けてその部位に遊走して病原体を貪食し、殺菌する機能を有しており、非特異的感染防御の重要な役割を果たしている。そこで、

ウシラクトフェリンの経口投与がこれらの好中球機能に及ぼす影響を明らかにするため、好中球の吸着能、貪食能、殺菌能および貪食に關する膜表面にある補体レセプターCD35 (complement receptor 1) の発現率を調べた。その結果、7日間のウシラクトフェリンの経口投与後、非特異的貪食能は、無症状キャリア (AC) 期FIV陽性ネコで有意に増加していた(図3A)。Sato et al. [16] によると14日間投与したFIV陰性ネコにおいても貪食能が有意に増加していたことから、反応の時期の違いはあるものの貪食能をウシラクトフェリンは増強することが明らかとなった。また、殺菌能を評価している化学発光の強度は増加傾向にあり、反応ピーク時間も短縮傾向にあった(図3B)。非特異的貪

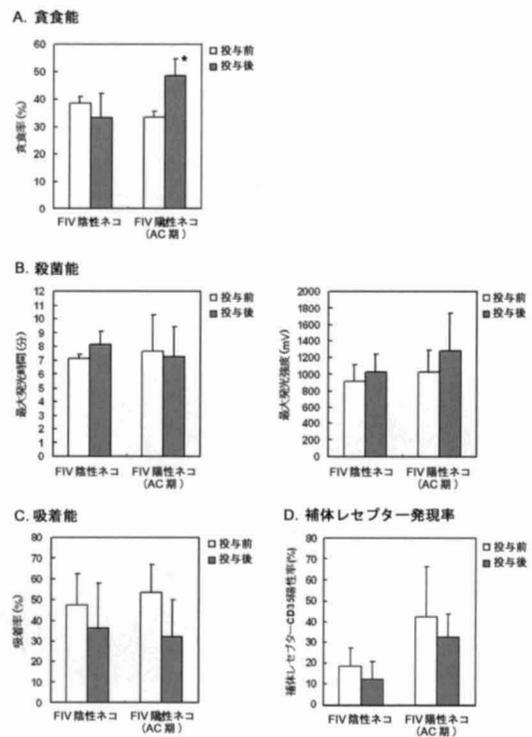


図3 ウシラクトフェリンの経口投与が好中球機能およびレセプター発現へ及ぼす影響

FIV陰性ネコ (n=4) および無症状キャリア (AC) 期FIV陽性ネコ (n=4) に対し、ウシラクトフェリン40mg/kgを7日 (A-C) ないし14日間 (D) 経口投与した。投与前後にカラム法による好中球の貪食能 (A)、ルミノール化学発光試験による殺菌能 (B)、吸着能 (C) および膜補体レセプターCD35の発現率 (D) を測定した。アスタリスク (*) は、投与前後の統計学的有意差 (p<0.05) を示す。

食能および殺菌能を促進する方向に働く一方で、ウシラクトフェリンは、吸着能および補体レセプターCD35発現率を抑制する方向に作用する現象も認められた(図3 C, D)。後者は、炎症を感知した好中球が血管内皮細胞に接着し炎症部位へと浸潤し、病原体に付着する際に重要な働きをして炎症の進展に深く関わる。したがって、ウシラクトフェリンは好中球の炎症に対する反応を抑制しながら、同時に非特異的免疫能を保持させていることが考えられた。実際、さまざまな炎症モデルでウシラクトフェリンの抗炎症効果が顕著に現れている報告が多くあり[19, 22]、口内炎に対するウシラクトフェリン療法の治療効果のひとつには好中球機能の調節作用が関与していることが考えられた。

ウシラクトフェリンがリンパ球機能に及ぼす影響

好中球などの貪食細胞が病原体に反応すると、その情報がリンパ球へ伝達され特異的免疫機構が動き出す。その情報伝達は、直接の細胞間相互作用とサイトカインによってなされるが、近年サイトカインネットワークが、免疫応答および炎症反応の調節において重要な役割を果たしているとの認識が強まってきている。ラクトフェリンの研究でも、炎症性サイトカインを含む種々のサイトカインの発現や産生へ与える影響について調べられ、数多くの報告がなされている[4, 21]。そこで、次にウシラクトフェリンの添加培養がネコの単球およびリンパ球(末梢単核球)における炎症性サイトカインの発現に及ぼす影響を調べた。その結果、FIV陰性ネコおよびFIV陽性ネコの末梢単核球において、ウシラクトフェリンの添加培養は、刺激に反応して増加したインターフェロン(IFN)- γ の発現を未刺激の状態まで減少させることが明らかとなった(図4)。コンカナバリンA(ConA)刺激前後の様々な時間にウシラクトフェリンを添加してもIFN- γ 発現を抑制したことから、刺激

後でも十分抑制効果があることが考えられた。このことは、炎症が起きてからでもウシラクトフェリンが炎症性サイトカインの発現を抑制できる可能性を示唆している。また、別の実験で、リポポリサッカライドで刺激して増加したインターロイキン(IL)-1および腫瘍壊死因子(TNF)- α もウシラクトフェリンの添加が定常状態までその発現を抑制したことから(データは示していない)、病原体や外部刺激によって生じた炎症性サイトカインの発現をウシラクトフェリンが調節し、抗炎症効果に関与していることが考えられた。

それでは、ウシラクトフェリンはどのような機序でサイトカインの発現を調節しているのだろうか。もともと、活性化したリンパ球、腸上皮細胞、好中球、マクロファージにはラクトフェリンレセプターが存在する[3, 17, 20]。

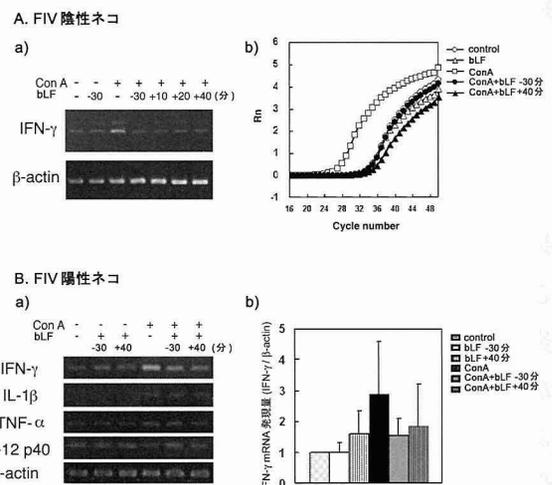


図4 ウシラクトフェリンがネコ末梢単核球におけるConA誘導サイトカイン発現へ及ぼす影響

ConA(終濃度 $10\mu\text{g/ml}$)にて刺激した細胞(5×10^6 個/ml)にウシラクトフェリン(bLF)終濃度 $500\mu\text{g/ml}$ を添加あるいは無添加し4時間培養した。bLF添加時間は次のように表した:-30; bLFをConA刺激の30分前に添加,+10,+20,+40; bLFをConA刺激の10,20,40分後に添加。FIV陰性ネコ(A)およびARC期FIV陽性ネコ(B)における各サイトカインの発現を半定量的RT-PCR法にて測定し、PCR産物は2%アガロースゲルにて電気泳動した(a)。

(A-b)リアルタイムRT-PCR法により測定したIFN- γ の増幅プロット。

(B-b)IFN- γ 発現の電気泳動像をグラフ化したもので、コントロールを1とした。

精力的な研究により、ラクトフェリンはレセプターを介して、あるいはエンドサイトーシスによって細胞内へ取り込まれ、核内まで移動し、さまざまな転写因子を調節することが明らかになりつつある [7, 15]. そして、最近ではラクトフェリンが細胞内のシグナル伝達経路に作用する可能性があげられ、ラクトフェリンレセプターもまたいくつかの免疫調節機能を調節しているのではないかとされている。このシグナル伝達は、私たちの生体を構成する細胞にとってなくてはならない大切な機構である。細胞の機能を維持するためには、細胞の中に存在するタンパク質をリン酸化、脱リン酸化させる反応を繰り返して、外界刺激を伝達していく必要があって、細胞増殖や分化から免疫応答まで実に多様な生理活性が制御されているのである。そこで、末梢血単核球におけるIFN- γ 産生にはチロシンキナーゼおよび細胞外シグナル調節キナーゼ経路が使用されるとの報告から [8, 11], ウシラクトフェリンの添加培養によるサイトカイン調節の機序を探るために、FIV陰性ネコにおける末梢血単核球の細胞内シグナル伝達経路との関係を検索した。その結果、ウェスタンブロッティングにより、チロシンキナーゼおよび細胞外シグナル調節キナーゼは、ConA刺激後10分以内に活性化し、刺激40分までには定常状態に戻ることが明らかとなった (図5 Aのバンド a および b, B)。さらに、ConAで誘導されたIFN- γ の発現がチロシンキナーゼ阻害剤および細胞外シグナル調節キナーゼ阻害剤によってある程度抑制されたことから (図5 C), ConA誘導IFN- γ の発現にはチロシンキナーゼおよび細胞外シグナル調節キナーゼシグナル伝達経路の活性化が必要であることが示された。しかし、前述の結果では、ウシラクトフェリンの添加が、ConA刺激の40分後、つまりConAによるチロシンキナーゼおよび細胞外シグナル調節キナーゼの活性化がすでに終了してしまった後でも、IFN- γ の発現を十分抑制していた。

この所見から、ウシラクトフェリンは、チロシンキナーゼ/細胞外シグナル調節キナーゼとは別の細胞内伝達経路あるいは細胞外シグナル調節キナーゼの下流を干渉することによって、ConA誘導IFN- γ 発現を抑制していることが示唆された。したがって、ウシラクトフェリンは、免疫細胞に対して、細胞外のみならず細胞内へも作用する可能性が考えられた。

以上の結果から、口内炎に対するウシラクトフェリンの局所投与は、口腔内の好中球機能およびリンパ球機能の免疫機能を維持させながらも、抗炎症効果を発揮することがひとつの機序となって口内炎の臨床症状を緩和していることが考えられた。また、ラクトフェリンは発痛物質であるプロスタグランジンE₂の産生を抑制すること、脊髄にある μ -オピオイドレセプターを介して痛みの下行性抑制系を刺激することで鎮痛作用を発揮することがすでに報告されており [2, 10], ウシラクトフェリン塗布後に早期に観察される疼痛の減少あるいは消失に関わっ

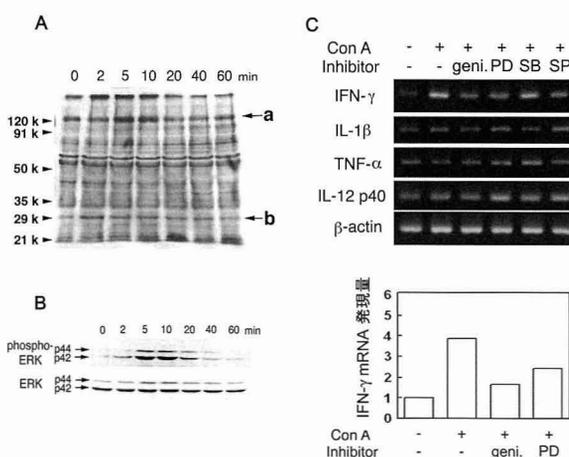


図5 FIV陰性ネコ末梢血単核球におけるConA誘導IFN- γ 発現とチロシンキナーゼおよび細胞外シグナル調節キナーゼとの関係

(A) ConAが誘導するチロシンリン酸化の経時変化。(B) ConAが誘導する細胞外シグナル調節キナーゼ(ERK)リン酸化の経時変化。(C) 各種キナーゼ阻害剤がFIV陰性ネコ末梢血単核球におけるConA誘導サイトカインの発現に及ぼす影響。geni.:チロシンキナーゼ阻害剤, PD:細胞外シグナル調節キナーゼ阻害剤, SB:p38阻害剤, SP:ストレス活性化プロテインキナーゼ阻害剤。

ていると考えられている。その多様な生物学的活性から考えても、口内炎に対するウシラクトフェリンの治療機序の解明にはさらなる検討が必要であると思われる。ラクトフェリンには、まだ多くの可能性が秘められており、口内炎症例の臨床応用のほかにも、好中球機能低下症や腫瘍性疾患症例などに対する使用も今後さらに検討されていくものと考えられる。そして、ラクトフェリンが補助療法として、一例でも多くの症例の役に立つことを願っている。

引用文献

- [1] Bard E, Laibe S, Clair S et al. : J Acquir Immune Defic Syndr, 31, 276-284 (2002)
- [2] Bartal L, Padeh S, Passwell JH : Pediatr Res, 21, 54-57 (1987)
- [3] Birgens HS, Karle H, Hansen NE et al. : Scand J Haematol, 33, 275-280 (1984)
- [4] Crouch SP, Slater KJ, Fletcher J : Blood, 80, 235-240 (1992)
- [5] Curnutte JT, Whitten DM, Babior BM : N Engl J Med, 290, 593-597 (1974)
- [6] Ellison RT^{3rd}, Giehl TJ : J Clin Invest, 88, 1080-1091 (1991)
- [7] Garre C, Bianchi-Scarra G, Sirito M et al. : J Cell Physiol, 153, 477-482 (1992)
- [8] Giovannetti A, Aiuti A, Pizzol, PM et al. : Clin Exp Immunol, 100, 157-163 (1995)
- [9] Gu YC, Bauer TR^{Jr.}, Ackermann MR et al. : Comp Med, 54, 363-372 (2004)
- [10] Hayashida K, Takeuchi T, Shimizu H et al. : Brain Research, 965, 239-245 (2003)
- [11] Mainiero F, Gismondi A., Soriani A. et al. : J Exp Med, 188, 1267-1275 (1998)
- [12] Masson PL, Heremans JF, Dive CH : Clin Chim Acta, 14, 735-739 (1966)
- [13] Nemet K, Simonovits I : Haematologia (Budap) 18, 3-12 (1985)
- [14] Pauline PW, Sonia UL, Orla MC : Biochem Cell Biol, 80, 95-102 (2002)
- [15] Penco S, Pastorino S, Bianchi-Scarra G et al. : J Biol Chem, 270, 12263-12268 (1995)
- [16] Sato R, Inanami O, Tanaka Y et al. : Am J Vet Res, 57, 1443-1446 (1996)
- [17] Talukder M J, Takeuchi T, Harada E : J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med, 50, 123-131 (2003)
- [18] Tanida T, Okamoto T, Okamoto A et al. : J Oral Pathol Med, 32, 586-594 (2003)
- [19] Togawa J, Nagase H, Tanaka K et al. : Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 283, G187-195 (2002)
- [20] Van Snick JL, Masson PL : J Exp Med, 144, 1568-1580 (1976)
- [21] Wong CW, Seow HF, Husband AJ et al. : Vet Immunol Immunopathol, 56, 85-96 (1997)
- [22] Zimecki M, Miedzybrodzki R, Szymaniec S : Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 46, 361-365 (1998)