

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06375

研究課題名(和文) オートファジーの活性化に着目したラクトフェリンの新規機能の解明

研究課題名(英文) Investigation of a novel function of lactoferrin focusing on autophagy activation

研究代表者

相澤 修 (AIZAWA, Shu)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：10645899

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題はラクトフェリンによるオートファジー活性化の意義について明らかにすることを目的とした。腸管上皮細胞株に対するラクトフェリンの処理は、研究代表者が報告した他の細胞株と同様にオートファジーを活性化させた。また、ラクトフェリンは腸管バリア機能を向上させたが、この効果はリソソーム機能阻害剤により完全に抑制された。さらに、腸管バリア機能の向上に伴って、密着結合関連因子であるクローディン1の発現が増加することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ラクトフェリンによるオートファジー活性化は研究代表者が発見した生命現象であり、本研究課題によりその生理的意義の一端が明らかになったと考えられる。また、細胞自身が持つオートファジー活性を亢進させる天然由来成分の探索、および応用は、細胞内クリアランスを介した有効かつ新しい疾患予防・治療戦略としても期待されている。したがって、本研究課題で得られた成果を基盤として、将来的にラクトフェリンがオートファジー機能の低下に起因する炎症性腸疾患を含めた慢性疾患に対する創薬のシーズとなることも期待される。さらにラクトフェリンを含む乳製品に対して新たな付加価値を与えることも予想される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present study was to investigate the physiological role of lactoferrin-induced autophagy activation. Similar to our previous report, lactoferrin induced autophagy activation in the intestinal epithelial cell line. In addition, although lactoferrin strengthened epithelial barrier function, the effect was completely suppressed by treatment of lysosome inhibitors. Furthermore, lactoferrin increased mRNA and protein expression of claudin-1, an integral membrane protein involved in tight junction formation. These findings highlight a novel function of lactoferrin mediated by autophagy activation in intestinal epithelial cells.

研究分野：動物生産科学

キーワード：ラクトフェリン オートファジー 腸管上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

母乳は泌乳期乳腺の乳腺上皮細胞から分泌される外分泌液であり、タンパク質、脂質、糖質やミネラルなどを含有し、新生児の育成に必要な栄養要求量を満たしている。また、上記の栄養成分に加えて、生体を構成する器官の健全な発達や、未熟な免疫機能を補う生理活性物質を多く含有している。ラクトフェリン (lactoferrin) は母乳中に見出された鉄結合性の糖タンパク質である (Metz-Boutigue et al., 1984)。ラクトフェリンは分子量約 80 kDa のタンパク質であり、一本鎖のポリペプチドに数本の糖鎖が結合し、さらに二つの球状 lobe を形成している。各 lobe は N-lobe、ならびに C-lobe と呼ばれ、ヘリックス構造により連結している。各 lobe に一つの鉄イオンが高親和結合することが報告されており、その強度は血中に存在する鉄結合タンパク質であるトランスフェリンのおよそ 30 倍であると報告されている。母乳とともに新生児に摂取されたラクトフェリンは、鉄と強固に結合するというその性質から腸管内において鉄依存性細菌の増殖を抑制する静菌作用を持つ。特に、ラクトフェリンは分娩後数日の間に分泌される初乳中に高濃度含まれており (ヒト常乳中では 1 リットルあたり 1-3 グラムに対して初乳中では 5-7 グラム)、免疫系が未熟な新生児における生体防御因子として機能する。

ラクトフェリンは母乳に由来することから経口摂取が可能であり、国内外において育児用粉乳やサプリメントとして商品化もなされている。また、牛乳由来ラクトフェリンやヒト組換えラクトフェリンは、タンパク質医薬品としての試験が進められている。動物実験やヒトの臨床試験を含むこれまでの研究から、消化管内における鉄結合による静菌作用のみならず、腸管上皮細胞の増殖を促すこと (Buccigrossi et al., 2007; Reznikov et al., 2014)、大腸炎モデルマウスにおける腸粘膜ダメージを軽減させることや炎症性サイトカインのレベルを減少させること (Haversen et al., 2004) が報告されており、腸管組織に対して直接的に作用することも予想されている。このように、ラクトフェリンは母乳を摂取する乳児のみならず成体においても健康増進効果を持つと考えられている。

これまで述べてきたように、ラクトフェリンは生体内において多様な機能を持つことが知られている一方、その生物学的機能を発現させる分子機構については不明な部分を多く残している。研究代表者はラクトフェリンの生体内における機能を仲介する分子機構を探索する研究を行ってきた。その過程で、ラクトフェリンが細胞内の主要な分解機構であるオートファジーを活性化させることを新たに発見し、学術論文として報告した (Aizawa et al., 2017)。また、腸管組織におけるオートファジーの役割として、炎症性腸疾患患者の全ゲノム相関解析において、疾患感受性遺伝子としてオートファジー関連遺伝子が複数発見されていることや (Hampe et al., 2007; Rioux et al., 2007)、実際にオートファジー関連遺伝子を欠損させたマウスでは炎症性腸疾患に類似した症状を呈する (Yang et al., 2018) という実験的証拠が示されている。このことから、オートファジーは腸管組織の恒常性維持に重要であることが認められつつある。

2. 研究の目的

以上の背景を基盤として、本研究課題では研究代表者が発見したラクトフェリンによるオートファジー活性化の生理的意義を明らかにすることを目的とした。この目的を達成するため、ラット小腸由来上皮細胞株 IEC-6 を用いて、培養腸管上皮細胞モデルにおけるラクトフェリンによるオートファジー活性化、および腸管バリア機能に及ぼすラクトフェリンの効果とオートファジー活性化の意義について調べた。さらに腸管バリア機能向上における分子機構について、密着結合関連因子の発現に着目して研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) 腸管上皮細胞株におけるラクトフェリンによるオートファジーの活性化

ラット小腸由来上皮細胞株 IEC-6 を用いて研究を行った。IEC-6 に対してウシ乳汁由来ラクトフェリンを最終濃度 0-1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加し 24 時間培養した。培養終了後、オートファジーマーカーとして知られる microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) タンパク質に対するウェスタンブロットを行った。また、オートファジーフラックスを解析するため、リソソーム機能阻害剤であるクロロキン (chloroquine: CQ) とラクトフェリンを同時処理した細胞を用いて上記と同様に LC3 タンパク質に対するウェスタンブロットを行った。さらに、抗 LC3 抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、ラクトフェリン処理された細胞における LC3 タンパク質の細胞内局在を解析した。

(2) 腸管バリア機能に及ぼすラクトフェリンの効果とオートファジー活性化の意義

腸管バリア機能に及ぼすラクトフェリンの効果を調べるため、トランスウェル内の透過性膜上に IEC-6 を播種し上皮シートを形成させた。その後、7 日間にわたりラクトフェリン (1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を処理した細胞の経上皮電気抵抗値 (trans epithelial electrical resistance: TEER)

を測定した。また、傍細胞透過性を解析するため、上記と同様にラクトフェリン処理した細胞における蛍光標識デキストランの透過性を評価した。さらに、オートファジー活性化の意義を調べるため、リソソーム機能阻害剤である CQ、または bafilomycin A1 (BAF) とラクトフェリンを同時処理した細胞における TEER 値を測定した。

(3) 腸管バリア機能向上における分子機構の探索

ラクトフェリンによる腸管バリア機能向上に関連する分子機構を明らかにするため、密着結合の形成に関与するクローディングファミリーに着目し、それらの発現に及ぼすラクトフェリンの効果を調べた。IEC-6 に対してラクトフェリンを最終濃度 0-1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加し 24 時間培養した。培養終了後、細胞を回収し、リアルタイム PCR 法によりクローディングファミリーの遺伝子発現を解析した。また、発現量の変化が確認された遺伝子に関しては、ウェスタンブロット法によりタンパク質レベルでの解析も行った。

4. 研究成果

(1) 腸管上皮細胞株におけるラクトフェリンによるオートファジーの活性化

IEC-6 に対してラクトフェリンを処理した結果、オートファジー活性化の指標である LC3-II 量が濃度依存的に増加した (図 1A)。また、ラクトフェリンと CQ との同時処理によりオートファジーフラックスを解析した結果、上記で観察された LC3-II 量の増加は、オートファジーの活性化によるものであることが明らかとなった (図 1B)。さらに、ラクトフェリン処理により IEC-6 の細胞質中に抗 LC3 抗体陽性の構造物が出現した。このことから、ラクトフェリンは腸管上皮細胞株においてもオートファジーを活性化することが明らかとなった。

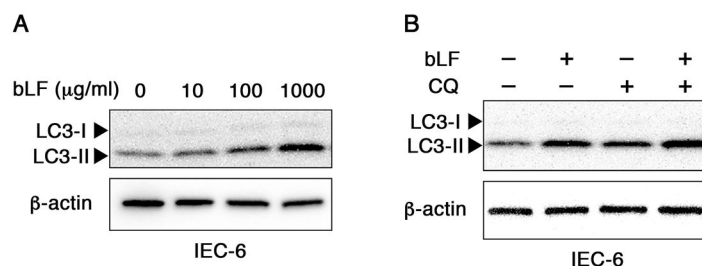


図1. IEC-6のオートファジー活性に及ぼすラクトフェリンの効果

(2) 腸管バリア機能に及ぼすラクトフェリンの効果とオートファジー活性化の意義

トランスウェル内の透過性膜上に播種した IEC-6 に対してラクトフェリンを処理した結果、腸管バリア機能の指標である TEER 値は有意に増加した。その一方で、蛍光標識デキストランの傍細胞透過性はラクトフェリン処理により有意に減少した。また、ラクトフェリンと、CQ や BAF などのリソソーム機能阻害剤との同時処理により、上記で観察されたラクトフェリンによる TEER 値の増加は完全に抑制された (図 2)。このことから、ラクトフェリンは腸管バリア機能を増強する効果を持つこと、ならびにこの効果にはリソソーム分解が関与することが明らかとなった。

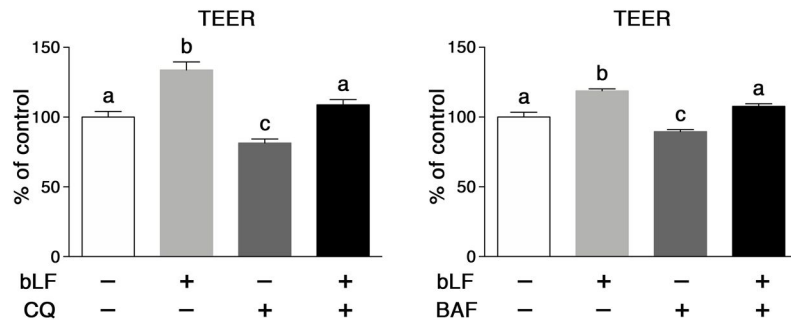


図2. IEC-6のTEER値に及ぼすラクトフェリンならびにリソソーム機能阻害剤の効果

(3) 腸管バリア機能向上における分子機構の探索

IEC-6 に対してラクトフェリンを処理した結果、密着結合の形成に関与するクローディングファミリーの内、クローディング 1 遺伝子の発現が顕著に増加した。また、クローディング 1 に関しては、遺伝子発現と同様にタンパク質レベルでの増加が確認された。さらに、クローディング 1 タンパク質の細胞内局在を調べた結果、対照群ではシグナルは認められなかったが、ラクトフェリン処理された IEC-6 において敷石上に並んだ細胞輪郭部に抗クローディング 1 抗体陽性のシグナルが観察された。

以上の結果から、研究期間を通じてラクトフェリンによるオートファジー活性化の生理的意義の一端を明らかにすることができた。研究期間中に得られた成果については現在専門学術雑誌に投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Daniel J Klionsky, Shu Aizawa, Amal Kamal Abdel-Aziz, Sara Abdelfatah, Mahmoud Abdellatif, Asghar Abdoli, Steffen Abel, Hagai Abeliovich, Marie H Abildgaard, Yakubu Princely Abudu, Abraham Acevedo-Arozena, Iannis E Adamopoulos, Khosrow Adeli, Timon E Adolph, Annagrazia Adornetto, Elma Aflaki, Galila Agam et al.	4. 巻 17
2. 論文標題 Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 1~382
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15548627.2020.1797280	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Shu Aizawa, Yutaka Yamamuro	4. 巻 32
2. 論文標題 Tyrosinase deficiency increases protein carbonyl content in substantia nigra of mice administered retinol palmitate	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 NeuroReport	6. 最初と最後の頁 121~124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/WNR.0000000000001566	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shihoko Komine-Aizawa, Shun Ito, Shu Aizawa, Takahiro Namiki, Satoshi Hayakawa	4. 巻 43
2. 論文標題 Cow milk exosomes activate NK cells and T cells in human PBMCs in vitro	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Immunological Medicine	6. 最初と最後の頁 161~170
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/25785826.2020.1791400	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shu Aizawa, Yutaka Yamamuro	4. 巻 132
2. 論文標題 Possible involvement of DNA methylation in hippocampal synaptophysin gene expression during postnatal development of mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 104587
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuint.2019.104587	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 相澤修
2. 発表標題 ラクトフェリンの新規機能について
3. 学会等名 第24回日本畜産学会若手企画シンポジウム【オンライン開催】（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 太田彩紀也、相澤修、山室裕
2. 発表標題 牛乳由来ラクトフェリンはラット小腸上皮細胞株IEC-6におけるオートファジー活性を促進する
3. 学会等名 第128回日本畜産学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 太田彩紀也、相澤修、山室裕
2. 発表標題 ラット小腸上皮細胞株IEC-6におけるLC3-IIタンパク質量に及ぼすラクトフェリンの効果
3. 学会等名 第50回乳腺・泌乳研究会研究集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------