

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：32608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24580197

研究課題名(和文)多機能性乳タンパク質活性本体の構造解析と生理活性の応用に関する研究

研究課題名(英文)Proteomic analysis of bioactive substances coexisted with a multifunctional milk protein and application of the biological functions

研究代表者

川上 浩(KAWAKAMI, HIROSHI)

共立女子大学・家政学部・教授

研究者番号：90458860

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：乳中の塩基性タンパク質であるラクトフェリンの多様な生理作用が、ラクトフェリンと特異的に結合している生理活性成分に由来するという仮説のもとに、生理作用の活性本体を明らかにすることを目的に研究を行った。プロテオーム解析で明らかとなったラクトフェリン結合成分を、多段階クロマトグラフィーで単離精製し、免疫調節作用や骨代謝改善作用について調べた。動物細胞培養系および疾患モデル動物実験系で検討した結果、免疫調節作用と骨芽細胞増殖作用をもつ複数のラクトフェリン結合成分が同定された。

研究成果の概要(英文)：Although a single substance, lactoferrin is known as being extremely multi-functional. We investigated the possibility that, besides the multi-functionality derived from the lactoferrin itself, lactoferrin expressed behaviors in conjunction with other bioactive components. Impurities in lactoferrin used as a reagent and food ingredient were fractionated using multi-stage methods, including affinity chromatography and ion exchange chromatography. The proteins and peptides present were examined using MALDI-TOF-MS proteomic analysis. Several components that exhibit bioactive characteristics, including immunomodulating effects and osteoblast proliferation were present among the impurities.

研究分野：農学

キーワード：食品機能

1. 研究開始当初の背景

ラクトフェリン(LF)は、塩基性の等電点をもつ分子量 80kDa の糖タンパク質である。現在までに、免疫調節作用、抗ウイルス作用、抗菌作用、骨代謝改善作用など、20種類以上の生理作用が報告されている。単一物質としては生理作用の多様性が極めて高く、乳の成分でありながら、医学文献データベース MEDLINE で文献検索を行うと、現在までに 7,000 報以上の研究報告がある。このような状況の中、*in vitro* 実験での LF の有効量が極めて多いことに対する疑問や、遺伝子組換え型 LF と乳由来 LF の生理作用の違いなども報告されている。現在、その原因は LF の糖鎖構造や高次構造の差にあるとされており、LF 自体が多機能性をもつタンパク質であるという考え方を基盤に研究が進められている。しかしながら、本研究代表者は「LF の多様な生理作用が、LF 自体の多機能性に由来するのではなく、複数の生理活性成分が、LF と特異的に結合していることで発揮されているのではないか」という仮説を立てて研究を推進し、現在までに次に示すような結果を得てきた。抗 LF モノクローナル抗体などを応用した多段階の高分離能クロマトグラフィーや、プロテインキナーゼによるリン酸化反応を利用した独自の検出法で解析し、市販 LF にはラクトジェニン、リポカリン、アンジオジェニン、FGF 結合性タンパク質などの生理活性タンパク質が多数含まれることを明らかにした。LF の作用としてすでに報告されているリボヌクレアーゼ活性、プロテアーゼ活性およびシステインプロテアーゼ阻害活性の本体が、LF と親和性のあるアンジオジェニン、プラスミンおよびシスタチン C であることを明らかにした。LF には骨代謝改善作用が報告されているが、LF と挙動をともにするアンジオジェニンおよびシスタチン C が、破骨細胞による骨吸収の抑制に影響を与えることを明らかにした。プロテオーム解析などの結果から、未知成分も含めて 100 種類以上のタンパク質やペプチドが、市販 LF に含まれる可能性を明らかにした。

これら様々な生理活性成分は、通常の LF 精製法では分離が困難であり、一定の特異性をもって LF と結合しているものと考えられる。現在、世界で研究に供されている市販 LF の調製法は、特許等の制約で試薬メーカーや乳素材メーカーごとに異なっており、LF 結合成分の種類や量に違いがあることを、本研究代表者はすでに明らかにしている。したがって、LF の生理作用が研究者によって異なることが多くみられる原因は、市販 LF の不均一性にあり、生理活性の発現が、LF と結合している各種生理活性成分の種類や量に依存している可能性があると考えられる。

本研究の特色は、LF の様々な生理作用が、LF の多機能性に由来するのではなく、特異的に LF と結合している複数の活性本体成分に起因することに注目していることである。LF

の生理作用に関する研究報告は多々あるが、現在までのところ LF 結合成分に着目して研究を進めている例はない。また、本研究代表者らが実施した無作為化二重盲検プラセボ対照ヒト試験で、腸溶性 LF の免疫調節作用を明らかにしているように、LF を真の生理活性成分の輸送タンパク質、あるいは安定化タンパク質という観点でとらえていることも、本研究の特徴である。さらに、本研究代表者は、ヒト消化管粘膜上皮細胞の刷子縁膜に、LF 受容体が存在することをすでに明らかにしている (Kawakami & Lonnerdal, *Am. J. Physiol.*, 1991)。したがって、本研究により、真の生理活性成分をターゲット細胞に直接送り届ける生理的システムの構築が可能となり、乳という極めて安全性の高い天然物を基盤にしたドラッグデリバリーシステム (DDS) の開発にも道が開ける。様々な LF の生理作用が、LF 結合成分に由来することが解明されれば、活性本体成分を単独で分離精製することで、低投与量で有効性の高い医薬品や機能性食品の原料素材とすることができる。また、遺伝子組換え技術等で活性本体成分自体を生産することも可能であり、医薬品への実用化をより早めることができる。さらに、LF は哺乳類の乳の中でも、ヒト母乳に特異的に多く含まれるタンパク質であることから、LF と挙動をともにする生理活性成分を明らかにすることができれば、安全性の高い乳児用医薬品の開発に結びつく可能性もある。特に、母乳栄養児と人工栄養児における免疫機能や神経系発達機能の違いが、様々な生理活性成分と結合する LF の含有量において、母乳と牛乳の間に 10~100 倍の差があることに起因するという仮説に立つと、本研究がもたらす発展性は計り知れない。母乳栄養児が様々な感染症にかかりにくい理由としては、母乳が免疫グロブリン IgA 等の生体防御因子を含有することによると考えられているが、こうした抗体成分は母親の感染歴に左右されるものであり、抗原特異的な生体防御因子が、乳児の生育する環境でも現実的に機能する可能性はそれほど高くないと思われる。さらに、知能の発達や精神制御能力に関しても、母乳栄養児と人工栄養児の間に差があるという研究もある。こうした観点からも、母乳中に含まれる免疫機能調節因子あるいは神経機能調節因子の解明が待たれている。したがって、21 世紀の少子高齢社会において、乳幼児および高齢者のための医療が益々重要視される中で、母乳と牛乳の最も大きな差の一つである LF の生化学的特性に起因する生理作用の違いを、LF 結合成分の解明という観点から研究を進めていくことは、極めて独創的で発展性の高いものであると考える。

2. 研究の目的

LF の多様な生理作用が、LF と特異的に結合している微量成分 (LF 結合成分) に由来す

るという仮説のもとに、LFの様々な生理作用の活性本体(真の生理活性成分)を明らかにし、医薬品あるいは機能性食品等の有効成分として活用することを目的とする。特に、無作為化二重盲検プラセボ対照ヒト試験で、本研究代表者らが明らかにした腸溶性LFの免疫調節作用の活性本体を特定するとともに、LF結合成分輸送タンパク質としてのLFの機能を解明することを目指す。具体的には、プロテオーム解析で示唆されている100種類以上のLF結合成分の中から、現在までに構造決定してきた成分について、LF自体の作用と比較しながら、免疫調節作用や骨代謝改善作用などを、培養細胞系で明らかにする。培養細胞系で活性が確認されたLF結合成分については、経口摂取での作用を明らかにする動物実験に向け、生体成分精製装置AKTAexplorer10S(GE Healthcare)を用いて、経口投与に十分な量を未変性な状態で分離精製する。動物実験系では、LF結合成分の単独投与とLF結合型投与を比較し、既に報告されているLFの効果との対照解析を行いながら、活性本体の輸送タンパク質としてのLFの有用性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) LF結合成分の同定と分離精製: ウシLFに対するモノクローナル抗体は、アメリカ生物資源バンクATCCより入手したマウスハイブリドーマHB-8852を、無血清培地S-Clone SF-Bで培養して得た。HiTrap Protein G HP(GE Healthcare)で精製した抗LFモノクローナル抗体を、HiTrap NHS activated HP(GE Healthcare)に固定化して、LF分離用アフィニティー担体を調製した。本担体を充填したカラムで市販LFからLFを取り除き、非吸着画分をLF結合成分として回収し、凍結乾燥した。

レーザーイオン化飛行時間型質量分析計(MALDI-TOF-MAS)AXIMA CFR plus(SHIMADZU BIOTECH)を用いて、ペプチドマスフィンガープリンティング(PMF)法で質量分析した。タンパク質同定システムMAS-COT Server(Matrix Science)で、LF結合成分に含まれるタンパク質およびペプチドを同定し、108種類のLF結合成分の存在を確認した。生体成分精製装置AKTAexplorer 10Sを用いて、それらを未変性状態で精製できる条件を検討した。具体的には、ヘパリン固定化アフィニティー担体Affigel Heparin(Bio Rad)、陽イオン交換担体Mono S 10/100 GL(GE Healthcare)、陰イオン交換担体Mono Q 10/100 GL(GE Healthcare)、ゲルろ過担体Superdex Peptide 10/300GL(GE Healthcare)などを用いて、多段階クロマトグラフィーを行った。

(2) 培養細胞系での生理機能評価: マスト細胞株RS-ATL8を用いたルシフェラーゼレ

ポータージーンアッセイで、IgE受容体(Fc RI)架橋反応によるマスト細胞活性化を調べた。RS-ATL8細胞を培養した培養液に、マウスIgEを添加した後、抗マウスIgE抗体でFc RIに結合したIgEを架橋した。この架橋シグナルに応答するルシフェラーゼ活性の発現を、ルシフェリンの酸化反応に基づく化学発光強度としてマイクロルミノメーターLuMate(Awareness Technology)で検出した。IgEおよび抗IgE抗体を作用させるとともにLF結合成分を培養液に添加し、Fc RIの架橋によるマスト細胞活性化反応を抑制する成分をスクリーニングした。LFをはじめとする乳中の塩基性タンパク質には骨代謝調節作用が報告されており、免疫機能と骨代謝機能が相互依存的に影響を及ぼし合うことも示唆されていることから、骨芽細胞の増殖に及ぼす作用を調べた。骨芽細胞株MC3T3-E1を培養し、プロモデオキシウリジン(BrdU)のDNAへの取り込み量を、パーオキシダーゼ標識抗BrdU抗体を用いた酵素標識免疫測定法(ELISA)で評価した。

(3) 動物実験系での活性評価: 型糖尿病モデルNODマウスの脾臓細胞を用いて、ConAあるいは抗CD3抗体で刺激した際のサイトカイン産生に及ぼす影響を調べた。BALB/c系、C3H/HeN系、およびC57BL/6N系マウスを、あらかじめOVAあるいはスカシ貝ヘモシアニン(KLH)で免疫し、リンパ節細胞を採取して、抗原特異的な刺激によるT細胞増殖応答を、³H標識チミジンの取込み量を指標に評価した。卵白アルブミン(OVA)特異的T細胞抗原レセプター(TCR)を発現するD011.10TCRトランスジェニックマウスを用いて、T細胞増殖応答調節作用について調べた。BALB/c系マウスの脾臓細胞については、抗CD3抗体およびLF結合成分を添加した培地で培養し、フローサイトメーターでCD4⁺T細胞の存在比率を調べた。BALB/c系マウス、C3H/HeN系マウス、C57BL/6N系マウス、D011.10マウスを用いた実験では、免疫応答指標であるサイトカインの産生に及ぼす影響についても調べた。

4. 研究成果

(1) 抗マスト細胞活性化作用: マスト細胞株RS-ATL8細胞によるルシフェラーゼレポータージーンアッセイにより、Fc RIの架橋反応によるマスト細胞活性化を抑制する成分をスクリーニングした。市販LF、アフィニティー精製LF、およびLF結合成分についてルシフェラーゼ活性抑制作用を調べたところ、市販LFおよびLF結合成分2種類に、マスト細胞活性化抑制作用が確認された。一方、精製LFには非常に弱い活性しかみられなかった。

- (2) 自己免疫疾患抑制作用：I型糖尿病モデル NOD マウスの naive 脾臓細胞を、ConA、抗 CD3 抗体、および LF 結合成分を添加して培養し、培養上清中の IL-4、IL-6、IL-10、IL-12 の量を ELISA で測定した。ConA や抗 CD3 抗体で脾臓細胞を刺激した場合は、IL-4 および IL-12 は産生しなかったが、IL-6 および IL-10 の産生が亢進した。さらに LF 結合成分を添加して、脾臓細胞を継続培養すると、ラクトパーオキシダーゼ(LPO)を加えた際に、IL-10 産生量が大きく増加した。また、脾臓細胞を、ConA や抗 CD3 抗体に加えて LPO を添加して培養し、ConA や抗 CD3 抗体単独添加群と比較して IL-10 の産生量が大幅に増加した培養系に、LF 結合成分中の低分子ペプチドを加えたところ、IL-10 産生量は減少し、IL-6 産生量は増加することが明らかとなった。低分子ペプチドによる脾臓細胞の IL-10 産生抑制作用および IL-6 産生促進作用は、10 週齢時の糖尿病未発症状態、および 35 週齢時の糖尿病発症状態と同様であった。
- (3) T 細胞増殖応答調節作用：OVA で免疫した BALB/c 系マウスのリンパ節細胞を培養し、OVA および抗 CD3 抗体の刺激による T 細胞増殖応答に対する LF 結合成分の影響を調べた。本培養系に低分子ペプチドを添加すると、添加濃度の増加にともなって T 細胞の増殖が抑制された。この T 細胞増殖応答抑制作用は、培養開始時に OVA とともに低分子ペプチドを添加した場合だけでなく、OVA 刺激 3 日後に低分子ペプチドを添加しても認められた。また、事前免疫を施していない BALB/c 系マウスの naive 脾臓細胞における抗 CD3 抗体刺激による T 細胞増殖応答も、低分子ペプチドの添加により有意に抑制された。さらに、このような T 細胞増殖抑制作用は、BALB/c 系マウスだけではなく、C3H/HeN 系や C57BL/6N 系のマウスのリンパ節細胞を用いた場合にもみられた。また、抗原を OVA から KLH に変更した場合でも観察された。すなわち、低分子ペプチドの T 細胞増殖応答抑制作用は、MHC 拘束性や抗原特異性に関わらず発揮されたものと考えられた。さらに、BALB/c 系マウスの naive 脾臓細胞を低分子ペプチドとともに 3 日間培養し、低分子ペプチドを含む培養液を完全に除去した後、あらかじめ OVA で免疫した BALB/c 系マウスのリンパ節細胞と混合培養した。その結果、OVA に特異的な T 細胞増殖応答が全く抑制されないことが分かった。この結果から、低分子ペプチドは、制御性 T 細胞などの免疫抑制細胞を誘導することで抑制作用を発揮するのではなく、直接 T 細胞に作用していることが示唆された。また、あらかじめ OVA で免疫した BALB/c 系マウスのリンパ

節細胞に、低分子ペプチドを作用させて 1～3 日間培養し、低分子ペプチドを含む培養液を完全に除去した後、抗 CD3 抗体あるいは OVA で刺激を与えてさらに培養した。その結果、T 細胞増殖応答が完全に抑制されることが明らかとなった。したがって、低分子ペプチドは、抗 CD3 抗体や抗原刺激に対する T 細胞の応答を抑制する作用をもつものと考えられた。また、BALB/c 系マウスの脾臓細胞を抗 CD3 抗体で刺激し、低分子ペプチドを添加して培養した後、フローサイトメーターで CD4⁺T 細胞の存在比率を調べた。その結果、CD4⁺T 細胞の存在比率が、低分子ペプチドの添加により低下することが明らかとなった。

- (4) サイトカイン産生調節作用：BALB/c 系マウスの脾臓細胞から CD4⁺T 細胞を単離し、低分子ペプチドの存在下において抗 CD3 抗体で刺激し、培養上清中のサイトカイン産生量を測定した。その結果、IL-4、IL-10、IL-17、および IFN- γ の産生量が低下した。以上より、低分子ペプチドは、TCR 刺激により活性化された CD4⁺T 細胞の応答を抑制することが明らかとなった。また、OVA 特異的 T 細胞受容体を発現する D011.10 トランスジェニックマウスの脾臓細胞を用いて、食物アレルギー抑制作用を評価した。D011.10 マウスから採取した脾臓細胞を OVA で刺激しながら培養し、低分子ペプチドを培養液に添加したとき、産生されたサイトカインの量を ELISA で測定した。その結果、IL-6 の産生量には変化がなかったが、IL-4、IL-10、IL-17、および IFN- γ の産生が抑制された。
- (5) 骨芽細胞増殖作用：BrdU の DNA への取り込み量を、パーオキシダーゼ標識抗 BrdU 抗体を用いた ELISA で評価したところ、骨芽細胞増殖作用が確認できた LF 結合成分は、インスリン様成長因子-1 (IGF-1)、IGF-2、繊維芽細胞増殖因子 (FGF) であった。一方、アフィニティー精製 LF、アンジオジェニン、シスタチン C、LPO、低分子ペプチド、その他 LF 結合成分には、骨芽細胞増殖作用はみられなかった。したがって、骨芽細胞増殖作用を示す乳中塩基性タンパク質の活性本体は、IGF-1、IGF-2、および FGF であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

- (1) Kawakami, H., Park, H., Park, S., Kuwata, H., Shephard, R. J., Aoyagi, Y., Effect of enteric coated lactoferrin supplementation on the immune function of elderly individuals: a randomized double blind, placebo controlled trial, Intern. Dairy J., 47, 79-85, 2015.

- (2) Kawakami, H., Physicochemical and biochemical characteristics of basic proteins in milk, *Milk Sci.*, 62, 85-104, 2013.
- (3) Kawakami, H., Hayakawa, K., Nagata, K., Tanokura, M., Proteomic analysis of impurities coexisted with lactoferrin, *Milk Sci.*, 62, 29-37, 2013.
- (4) Kawakami, H., Biological significance of milk protein and its receptor in mammalian tissues, *Milk Sci.*, 61, 125-140, 2012.
- (5) Nakamura, R., Ishiwatari, A., Higuchi, M., Uchida, Y., Nakamura, R., Kawakami, H., Urisu, A., Teshima, R., Evaluation of the luciferase assay based in vitro elicitation test for serum IgE, *Allergol., Intern.*, 61, 431-437, 2012.
- (6) Mizutani, N., Sugita-Konishi, Y., Omoe, K., Shinagawa, K., Kawakami, H., Kanno, S., Sugiyama, K., Kamata, Y., Advantages of immunoglobulin Y for detecting Staphylococcal enterotoxin in a double sandwich enzyme-linked immunosorbent assay, *Intern. J. Food Sci. Technol.*, 47, 155-159, 2012.

〔学会発表〕(計 17 件)

- (1) 川上 浩：母乳の神秘を解き明かす、日本腎不全看護学会、2015 年 11 月 14 日、名古屋国際会議場。
- (2) 渡辺 大、細井瑛耶佳、八村敏志、川上 浩、榎本 淳：免疫疾患モデルマウスのサイトカイン応答に及ぼすミルクペプチド画分の抑制効果、日本食品免疫学会、2015 年 10 月 15 日、東京大学。
- (3) 加藤 葵、矢端章宏、若井寿樹、八村敏志、川上 浩、榎本 淳：ミルクペプチド画分の T 細胞応答抑制効果、日本動物細胞工学会、2015 年 7 月 9 日、東北大学。
- (4) 川上 浩、母乳の不思議：何故、母乳栄養児に貧血が少ないのか、日本透析医学会、2015 年 6 月 26 日、パシフィコ横浜。
- (5) 若井寿樹、八村敏志、川上 浩、榎本 淳：マウスサイトカイン応答に及ぼすミルクペプチド画分の抑制効果、日本食品免疫学会、2014 年 10 月 16 日、東京大学。
- (6) Kawakami, H., Park, H., Park, S., Kuwata, H., Aoyagi, Y., Effects of enteric coated lactoferrin supplementation on immune status in the elderly, Annual Conference & Exhibition of Functional Foods, Nutraceuticals, Natural Health Products and Dietary Supplements, October 14, 2014, Istanbul.
- (7) 矢端章宏、加藤 葵、中村圭介、八村敏志、川上 浩、榎本 淳：ミルクペプチド画分の T 細胞応答調節効果() 酪農科学シンポジウム、2014 年 9 月 12 日、昭和女子大学。
- (8) 佐藤真名美、木下彩子、八村敏志、榎本 淳、川上 浩：ミルクペプチド画分の T 細胞応答調節効果() 酪農科学シンポジウム、2014 年 9 月 12 日、昭和女子大学。
- (9) 真下和樹、八村敏志、川上 浩、榎本 淳：T 細胞応答に及ぼすミルクペプチド画分の作用() 日本食品免疫学会、2013 年 10 月 17 日、東京大学。
- (10) 佐藤真名美、木下彩子、八村敏志、榎本 淳、川上 浩：T 細胞応答に及ぼすミルクペプチド画分の作用() 日本食品免疫学会、2013 年 10 月 17 日、東京大学。
- (11) Kawakami, H., Park, H., Park, S., Kuwata, H., Aoyagi, Y., Effect of enteric coated lactoferrin supplementation on immune markers in serum of healthy elderly individuals: a randomized, double blind, placebo controlled trial, International Conference on Lactoferrin, October 6, 2013, Rome.
- (12) Enomoto, A., Takeuchi, T., Takahashi, K., Chibana, M., Hachimura, S., Kawakami, H.: Interleukin-10 producing regulatory cells induced by cow's milk lactoperoxidase, The 25th Annual and International Meeting of JAACT, November 27, 2012, Nagoya Congress Center.
- (13) 川上 浩、朴 眩泰、朴 晟鎮、桑田英文、青柳幸利：高齢者における腸溶性ラクトフェリンの無作為化二重盲検プラセボ対照試験、日本ラクトフェリン学会、2012 年 10 月 27 日、昭和大学。
- (14) 中村圭介、八村敏志、榎本 淳、川上 浩：ラクトペーオキシダーゼの IL-10 応答誘導効果を抑制するミルクペプチド画分、日本食品免疫学会、2012 年 10 月 16 日、ヤクルトホール。
- (15) 川上 浩、朴 眩泰、朴 晟鎮、桑田英文、青柳幸利：腸溶性ラクトフェリンの摂取が健康な高齢者の免疫機能に及ぼす影響、日本食品免疫学会、2012 年 10 月 16 日、ヤクルトホール。
- (16) 川上 浩、朴 眩泰、朴 晟鎮、桑田英文、青柳幸利：腸溶性ラクトフェリンの免疫調節作用、酪農科学シンポジウム、2012 年 8 月 17 日、大妻女子大学。
- (17) 中村亮介、中村里香、星川 彩、樋口雅一、川上 浩、手島玲子：培養マスト細胞株を用いたアレルギー試験による抗アレルギー活性物質のスクリーニング、日本食品化学学会、2012 年 6 月 21 日、函館五島軒。

〔図書〕(計 2 件)

- (1) Kawakami, H., Peptide and protein

increase mineral absorption and improve bone condition, in “ Bioactive Food Proteins and Peptides: Application in Human Health ”, CRC Press, 219-236, 2012.

- (2) 川上 浩, 朴 眩泰, 朴 晟鎮, 桑田英文, 青柳幸利, 高齢者の免疫機能に及ぼす腸溶性ラクトフェリンの作用: 無作為化二重盲検プラセボ対照試験, ラクトフェリン, 日本医学館, 73-78, 2013.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

川上 浩 (KAWAKAMI HIROSHI)

共立女子大学・家政学部・教授

研究者番号 : 90458860