

氏名（本籍）	いいだ きりこ 飯田 季里子（東京都）
学位の種類	博士（学術）
学位記番号	博甲第 39 号
学位授与年月日	令和 6 年 3 月 15 日
学位授与の要件	共立女子大学大学院学則第 41 条第 1 項該当
論文題目	ラクトフェリンペプチドの免疫調節作用と その応用に関する研究
論文審査委員	（主査） 教授 川上 浩 教授 吉浦 健太 高橋 大輔 教授 深津 佳世子 守隨 香

論文内容の要旨

【序章】乳や涙などの外分泌液に含まれるラクトフェリン(LF)には、抗菌作用、免疫調節作用、肥満抑制作用、骨形成作用など、単一の天然物質としては極めて多様な生理作用が報告されている。母乳に特に多いことから、LF の生理的な存在意義は、乳児の未熟な生体防御機能の補完や、体外から侵入する病原菌やアレルギー物質に対する免疫応答の調節にあると考えられている。一方、市販の LF 試薬を用いた実験での有効量が、生体内の LF 濃度よりも極めて多いことや、遺伝子組換え型と天然型の LF の作用が異なることも報告されている。このような差異が生じる主な原因が、市販 LF 試薬の純度の低さにあり、夾雑物として様々な酵素や免疫調節因子などが含まれることにある。

そこで本研究では、純度 100%に近い LF を精製し、LF およびその活性中心であると予想される LF ペプチドの免疫調節作用（潰瘍性大腸炎(UC)抑制作用）とその作用機構について検証した。

【第 1 章】LF の精製で一般的に用いられるヘパリンアフィニティークロマトグラフィーに加え、ウシ LF に対するモノクローナル抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを利用し、純度 100%に近い LF を脱脂ウシ初乳から精製した。また、LF の抗菌作用や抗真菌作用が、LF 分子中のアミノ酸 10～25 残基からなるペプチドにあり、その中でも複数個のア르기ニン(R)とトリプトファン(W)が集まるアミノ酸配列(RRWQWR)は、LF と他の物質や細胞との結合に関与することが知られており、生理作用の発現との関係で重要な部位である。また、炎症反応に関与する好中球の細胞外トラップ (NETs)放出が、LF やその部分ペプチド LFc_{in} 1-12 (FKCRRWQWRMKK)で阻害されることが、本申請者らの共同研究で明らかにされている。この LFc_{in} 1-12 にも RRWQWR というアミノ酸配列があり、NETs 放出が自己免疫疾

患の一種である UC の発症にも関与することから、LFcin 1-12 を化学合成で取得した。また、経口摂取した際に消化酵素で加水分解されないように、LFcin 1-12 のカルボキシ末端をアミド化したペプチド LFcin 1-12A も化学合成した。

【第 2 章】デキストラン硫酸ナトリウムの自由摂取で UC を発症させた病態モデルマウスを用いて、第 1 章で精製した高純度 LF、LFcin 1-12、および LFcin 1-12A の UC 抑制作用を検証した。UC は、びらんや潰瘍を形成する非特異的炎症疾患であることから、マウスから摘出した結腸の長さを測定するとともに、結腸の横断切片のヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色プレパラートを作製して、組織学的な評価も行った。その結果、抗菌作用、抗真菌作用、NETs 放出抑制作用などと同様に、LF だけでなく LF ペプチド (LFcin 1-12 および LFcin 1-12A) でも UC 抑制作用が発揮されることが明らかとなった。

【第 3 章】マクロファージ様の RAW264. 7 細胞と THP-1 細胞、好中球様の HL-60 細胞、および腸管上皮様の Caco-2 細胞を用いた細胞培養実験で、動物実験で確認した UC 抑制作用のメカニズムを探索した。高純度 LF および LF ペプチドを各細胞の培養液に添加しておき、その後にリポポリサッカライド (LPS) で炎症反応を惹起して、炎症性サイトカインの産生量を測定した。その結果、動物実験における UC 抑制作用のメカニズムとして、LF や LF ペプチドの NETs 放出抑制作用以外にも、粘膜固有層に存在する免疫担当細胞からの TNF- α 産生を抑制する作用が寄与する可能性が示唆された。

【結語】UC の患者数は世界で増加傾向にあり、日本では特定疾患（難病）に指定されていることから、UC 抑制作用が明らかになった LF ペプチドは、LF とともに機能性食品や医薬品の基材として応用できる可能性があると考えられる。また、NETs 放出や炎症性サイトカイン産生は、UC 以外の自己免疫疾患の発症にも関与する現象であることから、自己免疫疾患全般の予防や治療にも有用であると期待される。

論文の審査結果の要旨

2024 年 1 月 18 日に開催された研究科委員会人間生活学専攻会議において、本学位申請論文 (1 月 11 日提出) の審査委員会の設置が承認され、高橋大輔教授、守隨香教授、吉浦健太教授、深津佳世子教授、川上浩教授の 5 名による本審査が開始された。

本学位申請論文はもとより、その基盤となった外部投稿の原著論文は、3 名の査読者がいる学術誌 "International Dairy Journal" に、2023 年 10 月 19 日に掲載されたものであり、食品成分の生理機能における新たな知見を含む研究成果であった。また、この原著論文を本申請者の博士論文として使用する事については、共著者全員から署名捺印された同意書が得られた。

2024 年 1 月 31 日に審査委員 5 名による口述試験が行われ、本申請者による口頭発表および質疑応答が行われた。質疑応答の主な内容は、①実験結果を示す際の文末表現について、

②統計解析方法について、③背景や目的に関する俯瞰的解説の記載について、④根拠となる実験データの開示（提示）などに関するものであった。本申請者は、いずれの質問に対しても審査委員の意図を理解して適切に回答し、審査委員からの了解を得ることができた。また、本申請論文中の記載について指摘された修正を適切に行うことを約束し、審査委員全員から公聴会の開催が認められた。

2024 年 2 月 21 日に本学本館 508 講義室において公聴会が開催され、学外者を含む出席者 29 名のもとで、本論文申請者による口頭発表および質疑応答が行われた。プレゼンテーションの後、口述試験における指摘事項に関して適切に修正されている旨、審査委員から了解が得られた。およそ 1 時間の質疑応答が行われ、本申請者はその質問に対しても自分の言葉で適切に回答し、出席者の理解を得た。

本学位論文研究は、ラクトフェリン(LF)および LF 部分ペプチドの潰瘍性大腸炎(UC)抑制作用を明らかにし、その新たな作用機序も提示した。好中球細胞外トラップ(NETs)放出や炎症性サイトカイン産生は、UC 以外の自己免疫疾患の発症にも関与する現象であることから、自己免疫疾患全般の予防や治療に、本研究の知見は大いに貢献できるものと考えられ、博士の学位を授与する論文として十分な内容であると考えられた。