

本博士論文研究は、ラクトフェリン (LF) が食品および医薬品として人々の健康に資することを期待し、その一助として LF の免疫調節作用メカニズムを解明することを目的としている。

LF は、塩基性の等電点をもつ分子量 80 kDa の糖タンパク質である。哺乳類の乳や涙などの外分泌液に含まれるほか、好中球の二次顆粒などにも存在する。抗菌作用、抗カビ作用、免疫調節作用など 20 種類以上の生理効果に関する報告があり、単一の天然物質としては極めて幅広い多機能性をもつ。母乳に特に多く含まれることから、LF の生理的意義は、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抗原に対する免疫応答の調節にあると考えられている。一方、LF の生理効果を検討した *in vitro* 実験での有効量が、生体内の LF 濃度よりも極めて高いことや、遺伝子組換え型と乳由来型の LF の作用が異なることが報告されている。このような差異が生じる主な原因は、人乳 LF、牛乳 LF および遺伝子組換え LF の糖鎖構造の違いや、タンパク質の一次構造の違いなどにあるとされてきた。しかしながら、これまでの研究で使用された市販 LF 試薬の純度は 80~90% 程度であり、夾雑物として様々な酵素類、細胞増殖因子、免疫調節因子、抗菌ペプチドなどが含まれることが判明した。LF の生理効果を検証する実験では、それら夾雑物を除去した純度 100% に近い LF を使用する必要がある。

そこで本博士論文の第 1 章では、LF の精製で一般的に用いられるヘパリン固定化アフィニティー担体に加え、ウシ LF に対するモノクローナル抗体を固定化した担体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを行い、純度 100% に近い LF を脱脂ウシ初乳から調製した。

ウシ LF の抗菌作用や抗カビ作用の活性中心は、LF のアミノ (N) 末端に近いアミノ酸 10~25 残基のペプチドに存在することが、複数の研究者によって明らかにされている。特に、LF のアミノ酸配列の 17~41 番目に相当するアミノ酸 25 残基からなるペプチドは、ラクトフェリシン (LFcin) と命名されている。その中でも、塩基性のアルギニン (R) と疎水性のトリプトファン (W) が複数個あるアミノ酸配列 RRWQWR は、LF と他の物質や細胞との結合に関与することが分かっており、生理作用の発現との関わりで興味深い部位である。近年、炎症反応に関与する好中球からの細胞外トラップ (NETs) の放出が、LF やその部分ペプチド LFcin 1-12 (FKCRRWQWRMCK) によって阻害されることが明らかにされた。この LFcin 1-12 にも RRWQWR というアミノ酸配列がある。NETs 放出は様々な自己免疫疾患と関係があり、潰瘍性大腸炎 (UC) の発症にも関与する。また、乳タンパク質である LF の生理効果は、経口投与した検体が直接作用できる消化管で検証することが合理的かつ自然である。

そこで本博士論文の第2章では、第1章で分離精製した高純度 LF に加え、抗菌作用や NETs 放出阻害作用が報告された LFcin 1-12 を化学合成して UC 抑制作用を調べた。具体的には、デキストラン硫酸ナトリウムの自由摂取により UC を発症させた病態モデルマウスを用いて、LF および LFcin 1-12 の UC 抑制作用を検証した。また、LF ペプチドは塩基性アミノ酸や疎水性アミノ酸を多くもつことから、消化管内で加水分解を受ける可能性が高い。そこで、LFcin 1-12 のカルボキシ (C) 末端のリジンをアミド化したペプチド (LFcin 1-12A) を化学合成し、消化酵素耐性を付与して動物実験に供した。UC は、大腸の粘膜層や粘膜下層に、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、組織学的な評価も行った。その結果、LF による UC 抑制作用は、抗菌作用、抗真菌作用、NETs 放出抑制作用などと同様に、LFcin 1-12 のアミノ酸配列が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

次いで本博士論文の第3章では、マクロファージ様 RAW264.7 細胞および THP-1 細胞、好中球様 HL-60 細胞、および腸管上皮様 Caco-2 細胞による *in vitro* 細胞培養系で、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。具体的には細胞培養液にリポポリサッカライド (LPS) を添加して炎症反応を惹起し、高純度 LF および LF ペプチド (LFcin 1-12 および LFcin 1-12A) の抗炎症作用を調べた。その結果、動物実験での UC 抑制作用のメカニズムには、LF や LF ペプチドによる NETs 放出抑制作用だけでなく、粘膜固有層に存在するマクロファージや好中球からの TNF- $\alpha$  産生を抑制する作用も寄与する可能性が示唆された。特に、LFcin 1-12A が最も高い結腸萎縮抑制作用を示したことから、LFcin 1-12 の全アミノ酸配列が重要である可能性が示唆された。近年、UC は世界で患者数が増加傾向にあり、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として応用できると考えられた。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かかわる現象であることから、LF や LF ペプチドは自己免疫疾患全般の予防や治療にも応用できる可能性が期待された。