

論文の内容の要旨

氏名：山口 真

博士の専攻分野の名称：博士（生物資源科学）

論文題名：牛乳由来 α -ラクトアルブミンの抗炎症作用に関する研究

緒論

哺乳類の新生仔は出生後の一定期間を母親が分泌する乳のみを食物として摂取することで発育する。出生直後の新生仔には十分な感染防御機能や免疫機能は備わっていないことや、新生仔の成長速度は成体のそれと比べて顕著に早いことなどから、乳成分は単に栄養機能を果たすだけではなく、新生仔の健全な発育のための生理機能も有していると考えられている。ホエイにはこれらの生理機能を有している成分の多くが移行している。それゆえ、ホエイ画分に含まれる生理機能成分を加工・抽出し、バランス栄養食品や経管栄養向けの利用が高まっている。牛乳のホエイでは、主要な成分として β -ラクトグロブリン、 α -ラクトアルブミン、血清アルブミンと免疫グロブリン、わずかに含まれる成分としてラクトフェリンがあるほか、ビタミン結合タンパク質などの微量タンパク質の存在も知られている。

本研究では、 α -ラクトアルブミンの生理機能のひとつとして鎮痛および抗炎症作用に着目し、鎮痛および抗炎症作用を発揮するメカニズムを解明することを目的に、疼痛に対する作用（マウス酢酸ライジング）、急性炎症に対する作用（ラットカラゲニン浮腫）、慢性（亜急性）炎症に対する作用（ラットアジュバント関節炎）、アラキドン酸代謝関連酵素に対する阻害活性をそれぞれ検討した。さらに、ラット虚血再灌流モデル、マウス大腸発がんモデルを用いて、 α -ラクトアルブミンのもつ抗炎症作用に基づく新しい機能性を解明しようと試みた。

第1章 牛乳由来 α -ラクトアルブミンの新規作用:シクロオキシゲナーゼ-2 阻害による鎮痛および抗炎症作用

牛乳由来ホエイタンパク質にわずかに含まれる成分のラクトフェリンには酢酸や関節炎による痛みに対する軽減作用が報告されている。しかしながら、その作用メカニズムの詳細は明らかになってはおらず、また、ホエイタンパク質の主要な成分である β -ラクトグロブリンおよび α -ラクトアルブミンの作用に関しては不明であった。

そこで本研究では、ホエイタンパク質の主要な成分である β -ラクトグロブリンおよび α -ラクトアルブミンについて、鎮痛作用および抗炎症作用を評価した。 α -ラクトアルブミンの経口投与により（1）内臓痛・体性痛のモデルであるマウス酢酸ライジングテストでの疼痛関連行動の抑制効果、（2）急性炎症のモデルであるラットカラゲニン足浮腫および疼痛の抑制効果、（3）リウマチ性関節炎のモデルであるラットアジュバント関節炎モデルにおける関節の腫脹と疼痛反応の抑制効果を示した。一方、 β -ラクトグロブリンはこれらのモデルで効果を示さなかった。

つぎに、 α -ラクトアルブミンの鎮痛作用および抗炎症作用の機序を明らかにするために、ラットカラゲニン足浮腫モデルにおける後肢浸出液中のインターロイキン(IL)-6 とプロスタグランジン(PG)E2 を測定した。その結果、 α -ラクトアルブミンの経口投与により IL-6 および PGE2 の上昇が抑制されることを明らかにした。

さらに、 α -ラクトアルブミンのアラキドン酸代謝関連酵素に対する阻害活性について検討した結果、シクロオキシゲナーゼ (COX) およびホスホリパーゼ A2 を阻害することが判明した。さらに α -ラクトアルブミンは、

COX-1 に比較して COX-2 に対して選択的な阻害活性を示すことが明らかになった。

第2章 牛乳由来 α -ラクトアルブミンの小腸虚血再灌流障害に対する抑制効果

消化管は、食物の消化と吸収のみならず、生体防御を担う巨大な免疫器官、複雑な情報の授受を行う神経系器官、様々な生体調節因子を分泌する内分泌器官としても働いている。さらには、独特の代謝機能により恒常性維持に寄与し、生息する多様な微生物の力をも活用しているなど重要な役割も果たしている。腸管には体内の全免疫細胞の約 70%が存在しており、体内最大の免疫組織を構築している。ショックに起因した多臓器不全などの病態発生において、腸管での循環障害による炎症性サイトカインの産生や、粘膜バリアー機能の低下による腸内細菌のトランスロケーションが重要な役割を果たしていることが多くの基礎研究、臨床研究により明らかにされている。

本章では、腸管の循環障害のモデルである上腸間膜動脈虚血再灌流法を用い、ホエイタンパク質の消化管炎症に対する抑制効果を薬理的に解析した。

ラットの上腸間膜動脈を鉗子により虚血した後、再灌流することで、腸管の循環障害による炎症反応を誘導した。虚血の1時間前にホエイタンパク質分離物や、その主要な構成成分である β -ラクトグロブリンまたは α -ラクトアルブミンを十二指腸内に投与したラットでは、対照群（生理食塩水投与）に比較して、循環障害に伴う炎症反応の指標である IL-6 の産生が抑制された。また、その抑制活性は α -ラクトアルブミンが強かった。さらに、 α -ラクトアルブミンの血清中濃度と抗炎症作用の間に正の相関を確認した。

上述したラット腸管虚血再灌流モデルにおける α -ラクトアルブミンの抗炎症作用の発現機序について、一酸化窒素を中心に解析を行った。一酸化窒素は、IL-6 の産生に関与する転写因子 NF- κ B とその阻害タンパク質である I κ B との結合を安定化すること、NF- κ B のプロモーターへの結合を阻害することが報告されている。この一酸化窒素を介したシグナル伝達系を活性化する内因性リガンドとしては、エンドルフィン、カンナビノイド、IL-10、エストロゲンなどが知られている。

ラットの上腸間膜動脈をクランプにより虚血した後、再灌流することで、腸管の循環障害による炎症反応を誘導した。虚血の1時間前に α -ラクトアルブミンとともに、一酸化窒素合成酵素阻害剤である N^G-ニトロ-L-アルギニンメチルエステルを投与したラットでは、 α -ラクトアルブミンの IL-6 産生抑制作用は減弱した。従って、 α -ラクトアルブミンによる IL-6 産生抑制作用には、一酸化窒素による NF- κ B の阻害が一部関与している可能性が強く示唆された。

第3章 牛乳由来 α -ラクトアルブミンの大腸発がんに対する抑制効果

本章では、 α -ラクトアルブミンがもつ抗炎症作用を機能性食品などに応用することを視野に入れ、近年罹患数が激増しており、加齢により罹患率が高くなる大腸がん注目した。COX 阻害剤であるアスピリンの大腸がんに対する予防効果が実験的に示されて以来、プロスタグランジンとがん発生・増殖の関連性が推定されてきたが、非ステロイド系抗炎症剤 (NSAIDs, COX 阻害薬) の長期服用には腸管粘膜障害や出血などの副作用があり、COX 阻害薬を大腸がん予防のために常用することは推奨できない。長い食経験に基づき安全性が担保されており、COX-2 の阻害活性をもつ α -ラクトアルブミンは、副作用の課題なく大腸がんの発生を抑制する機能性タンパク質である可能性が考えられた。

そこで、 α -ラクトアルブミンの大腸発がん抑制効果を、アゾキシメタン (AOM) とデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) で誘発されるマウス大腸発がんモデルで検討した。その結果、 α -ラクトアルブミン添加食の給餌

によって、DSS 飲水時（大腸炎発症時）の便潜血は軽減され、大腸がんの発生個数は有意に抑制された。また、これらのマウスの大腸では、炎症・発がん関連物質である TNF- α 、IL-1 β の発現量は有意に減少していた。

つぎに、大腸発がん抑制機序を推察するため、AOM/DSS 併用モデルの DSS 炎症期に対する α -ラクトアルブミンの効果を検討した。その結果、DSS 単独投与群よりも、AOM と DSS を併用群の血漿中および大腸ホモジネート中のプロスタグランジン E2 濃度は高かった。また、 α -ラクトアルブミンの給餌によってこれらのプロスタグランジン E2 濃度は減少した。これらの結果から、 α -ラクトアルブミンは大腸発がんにおけるプロモーション段階でプロスタグランジン産生を抑制することにより、大腸発がんを抑制する可能性が示唆された。

さらに、 α -ラクトアルブミンが大腸発がんにおけるプログレッション段階に及ぼす効果を検証するため、AOM/DSS 併用モデルの DSS 炎症誘発後から α -ラクトアルブミンの給餌を開始したところ、大腸がんの発生個数は抑制されなかったが、大腸での TNF- α 、IL-1 β の発現量は減少した。これらのことから、大腸発がんの抑制にはプロモーション段階でのプロスタグランジン産生抑制が重要であることを明らかにし、 α -ラクトアルブミンはがん進行段階においても炎症関連物質の抑制を通して慢性炎症を改善することが示唆された。

以上の結果から、 α -ラクトアルブミンを長期にわたり摂取し続けることで、大腸粘膜での慢性炎症を抑制することにより、大腸発がんに伴うリスクを低減できる可能性を明らかにした。

総括

本研究では、牛乳由来 α -ラクトアルブミンの抗炎症作用に関して検討した。

第1章では、牛乳由来 α -ラクトアルブミンが鎮痛および抗炎症作用をもち、そのメカニズムとして従来の研究では報告されていないシクロオキシゲナーゼ-2 阻害活性をはじめて明らかにした。

第2章では、小腸虚血再灌流障害に対する抑制効果を検討する中で、一酸化窒素を介した抗炎症作用メカニズムを見出した。また、 α -ラクトアルブミンの血清中濃度と抗炎症作用の間に正の相関があることをはじめて明らかにし、血液中に吸収された α -ラクトアルブミンおよびそのペプチドが抗炎症作用の活性本体であることを示唆する結果を得た。

第3章では、 α -ラクトアルブミンの大腸発がんに対する抑制効果を検討するなかで、大腸発がんにおけるプロモーション段階でプロスタグランジン産生を抑制することが重要であることを明らかにした。また、 α -ラクトアルブミンはがん進行段階においても炎症関連物質の抑制を通して慢性炎症を改善することも示した。

本研究で示した α -ラクトアルブミンの抗炎症作用に関する成果は、炎症に起因する症状、疾病をもつ者に対しての適応をもつ、長期摂取が可能な安全で有用な機能性食品の開発における基礎的な知見を提供するものである。