

3月号 5ページ

※ 指定外のケイは、アタリケイです。  
※ 指定外の文字は、スミベタです。

**ドクトル中澤のぶらり研究室探訪記 18**

基礎研究をする仲間を求めて、全国のラボを訪れます。今日の訪問先は…

● 深掘りする論文  
Omiya K, Nakadate Y, Sato H, et al. Role of the protein kinase A signaling pathway and identification of mediators in the cardioprotective effects of enteral lactoferrin for ischemia-reperfusion injury in an isolated rat heart model. Nutrition 2023; 113: 112088.

● 摘要  
ラクトフェリンはトランスフェリンファミリーの糖タンパク質である。特に母乳中に含まれ、新生児の免疫系に関与し、抗炎症作用がある。ラットにおいて経腸ラクトフェリンが脳や腸管の虚血再灌流障害を和らげるという報告はあったが、心臓の虚血再灌流障害についてはわかつていなかった。われわれは2022年に、ラットのLangendorff装置を用いた気絶心筋モデルにおいて、経腸ラクトフェリンが虚血再灌流障害に對して心保護作用があることを示した。その作用経路としてプロテインキナーゼB (PKB) 経路を調べたが活性化はしておらず、経腸ラクトフェリンの心保護作用の具体的な作用経路はわからなかった。また、心臓にラクトフェリンを直接灌流しても心保護作用は示さず、経腸ラクトフェリンの心保護作用は経腸ラクトフェリンにより誘導または活性化される物質により起こることを報告した (Omiya et al. Cardioprotective effects of enteral vs. parenteral lactoferrin administration on myocardial ischemia-reperfusion injury in a rat model of stunned myocardium. BMC Pharmacol Toxicol 2022; 23: 78).

● 論文掲載までの道

研究テーマの決定	2019年春頃	カナダのMcGill大学への臨床留学の前だったので、ボスになるThomas Schricker先生の研究テーマに近い栄養について実験をしようと思いました。
研究費の取得	2020年春	科研費基礎研究(C)を得ました。申請書を書くための予備実験の費用は、当科の寄付金から出してもらいました。
研究	2019年夏~	実験日は週1日もらいました。実験日では、朝の麻酔導入が落ち着いた10時くらいから準備を始めて夜8時くらいまで、1日に3~4匹の灌流実験をするスタイルでした。
学会発表	2021年10月	サンディエゴで開催された米国麻醉科学会(ASA)の学術集会で発表しました。COVID-19の影響で、webポスターでした。
論文執筆	2020年11月~	できるだけわかりやすく、シンプルにということを心がけました。
投稿先の選定	2022年冬	先行研究の論文はアクセプトされるまでに10誌ほどからリジェクトされました。なので、今回の論文は基礎系の論文でも採択していて、かつLangendorffの論文を採択していて、栄養系ということから「Nutrition」を選びました。
投稿、アクセプト	2023年春	先行研究の論文がアクセプトされるのに時間がかかったので、今回は思ったより早いと感じました。先行研究があると通りやすいのかなと思いました。

◆ ドクトル中澤のぶらり研究室探訪記

▼ 図1 灌流液が入る筒 ローラーポンプ 大動脈と灌流装置の接続部 左室へバルーンの接続部

● 研究室へようこそ ～色ペタ+スミ20% (以下凡)

● 中澤 (以下、中) こんにちは。  
● 大宮 (以下、大) はじめまして。よろしくお願いします。

● 中 実は、以前にもお邪魔したことがあるんですよ\*1。

● 大 知っています。古藤田先生を訪問してくださったのですよね。古藤田先生からも、中澤先生によろしくお伝えくださいと先ほど言われました。

● 中 山梨大学は研究をしている人の数が多くて羨ましかったです。確かにいくつかのグループに分かれているのでしたよね。

● 大 はい。古藤田先生はペイン関係とか脳循環をテーマにしておられますね。ほかに体温をテーマにしているグループもあります。私は、小口 健史先生や中嶋 陽介先生の心筋代謝をテーマとしているグループで実験をしています。

● ● ● Langendorff装置って?

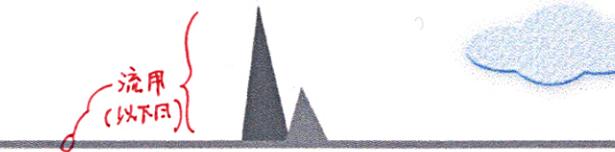
● 論文についての話に入る前に、Langendorff装置を見せてもらっていいですか?

● もちろんです。これです (図1) 11a B&W (以下凡)

● 心臓を取り出して灌流実験をする装置ですね。い

\*1 2023年4月号参照

● 脚注 9a ロダンM → ペタ  
13H 10w語 (以下凡)



素早く装置につなげて灌流させ、心臓の拍動を再開させます。その後は心筋温が37°Cになるように灌流液温度を調整します。

中 手早い手技が求められそうですね。

大 そうですね。手技が安定するまでに、3~4か月はかかりました。

中 虚血再灌流はどうやっているのでしょうか。

大 虚血をかけるのは、ローラーポンプをオフにすれば止まり虚血がかかります。あとは、虚血中にペーシングを222回にするようにしています。そうすることで虚血の程度が安定して、一定の虚血再灌流障害が作れるようになりました。

中 冠動脈に血流がない状態で15分くらいは動き続けられるものなんですか。

大 はい、結構動きますね。一応、30分以上虚血をかけたものが心筋梗塞モデルで、15分だと気絶心筋モデルになります。

中 リカバリーした後に不整脈とか起きないのでしょうか。

大 起きます。心室細動(VF)になって、そこから自力で立ち上がってくる感じです。

中 なるほど。やり方を聞いたり読んだりしたことはありましたか、実際にみたことがなかったのでイメージできなかったところがよくわかりました。

### ●●● 経腸ラクトフェリンまで

中 では、いよいよ論文の内容についても教えてください。まず、ラクトフェリンをターゲットにしたのが面白いと思います。なぜ、ラクトフェリンを選んだのでしょうか。

大 「子ども」と「栄養」で何かできないかなと考えてたどり着きました。

中 えっと……その二つのキーワードはどこから？

大 もともと私は小児心臓麻酔を担当することが多かったので「子ども」です。そして、この実験のことを構想しているタイミングで、翌年にカナダのMcGill大学に臨床研究留学をすることが決まり、その留学先のボス Thomas Schricker先生の専門分野の一つがenhanced recovery after surgery (ERAS)で、臨床研究としてアミノ酸投与をしたり、グルコース・インスリン療法をすると周術期の患者さんのアウトカムがよくなるというような仕事をしておら

るので、私も留学したら栄養系の研究をすることになるな、ということから「栄養」がキーワードになりました。子どもの栄養といったら、母乳かなと思つて、母乳の中の物質をいろいろ調べてみたら、ラクトフェリンという糖タンパク質があつたので、それを調べてみようということになりました。

中 なるほど。ラクトフェリンをターゲットにするとて、テーマの方向性としては、術後や予後にどのような影響を及ぼすかというアプローチもあると思ひますが、循環にターゲットを絞つたのはなぜでしょう。

大 私が加わっている山梨大の心筋虚血のグループは、Langendorff装置を使ってさまざまな物質を灌流させて循環動態を測るという実験系をもつています。そこで、インスリンが虚血再灌流障害に対して心保護作用があるというような実験をしていました<sup>\*2</sup>。ただ、Langendorff装置を用いたインスリンの研究はある意味、出尽くした感があったので、次なる灌流物質を探していて、ラクトフェリンにたどり着いたという背景もあり、循環のパラメータを測るのが自然な流れでした。

中 グループの特性を生かした実験なのですね。僕がこの論文で面白いなと思った点は経腸という部分です。先行研究<sup>\*3</sup>の内容になりますが、経口という投与経路になったのはなぜでしょうか。

大 私たちの実験グループはひたすら灌流液に何かを混ぜて効果を測ることをやっていたので、経口摂取させるという発想はまったくありませんでした。なので、最初はひたすら灌流液にラクトフェリンをいろいろな濃度で混ぜていたのですが、いくらやっても全然結果が出ませんでした。これはダメかな……と思って諦めかけていたのですが、中橋先生がふと「母乳ってそもそも飲むものだから、飲ませてみては？」とおっしゃって、なるほどそうかと思ってやってみたら結果が出たというところです。

中 最初は静注をイメージしてやっていたのですね。で、うまくいかないときに「そもそも」を考えなおして発想を転換させたと。面白いですね。でも実験をしていると、そういうふとしたアイディアがうまくいくことが多いですからね。

大 そうですね。ただ、飲ませ方がわからなかったので、YouTubeで勉強しました。

\*2  
Insulin preconditioning elevates p-Akt and cardiac contractility after reperfusion in the isolated ischemic rat heart. Biomed Res Int 2014; 2014: 536510.

\*3  
BMC Pharmacol Toxicol 2022; 23: 78.



メモ  
スベタ  
スベタスミ10% アディポサイトカイン ~新規B<sup>14</sup>

スミ50%  
地スミ10%  
ロダンM  
ベタ  
(17)H 24w詰

④2 中 灌流液中のラクトフェリンの投与量はどのようにして決めたのでしょうか。

大 参考にできる先行研究がみつかなかったので、ヒトの正常値が約0.2 μg/mLということから、倍にして、倍にして……と探っていました。

中 ということは、通常の新生児が血中濃度よりもかなり高濃度を投与しているということですか。

大 はい、先行研究<sup>4</sup>では75~100倍くらいの濃度を流したことになります。

中 普通は10倍くらい投与してダメだと諦めるかなと思うんですけど、よく粘りましたね。

大 そうですね。予備実験の段階で、教室の研究資金を使わせてもらっていたので、データが出ないのはまずいなと焦っていたので粘っちゃいました。

### ●●● 作用メカニズムに迫る

中 では、もう少し本題に。今回の実験では、対照群、ラクトフェリン投与群、H89投与群、ラクトフェリン+H89投与群の4群に分けています(Fig. 1)。H89というのは、PKA阻害剤ですね。

大 はい。H89が単独で心臓に作用していないことを確認するためにこの4群を設定しました。

中 H89を選んだということは、ラクトフェリンの作用にPKAが関与しているという仮説があるのだと思うのですが、どうしてそのような仮説に至ったのでしょうか。

大 ラクトフェリンが唾液腺とか脂肪細胞などでPKAを活性化しているという論文<sup>\*4</sup>がありました。心臓に関してはなかったのですが、ほかの細胞で活性化しているなら、心臓でも活性化しているかもしれないと考えました。一応、予備実験もしていけるデータだったので、このような4群を設定しました。

中 なるほど。それで循環動態のパラメータをみると、LV dP/dt max, 心拍数, LVEDPはラクトフェリン投与で虚血再灌流障害が抑えられていますが、H89を投与するとその効果がなくなっているということですね(Fig. 2)。

大 はい、そうです。

中 冠血流に差がなかったのはどう考えていますか。

大 冠動脈を拡張させる作用はなかったと考えています。

中 PKAのタンパクレベルをみても、ラクトフェリ群で有意に高い(Fig. 3)のでPKAが関与しているとして、PKAって、本当にいろいろな作用がありますよね。心臓だけでも、カルシウムチャネルに働きたり抗酸化作用もあったり。そこで、今回はラクトフェリンがPKAの発現を亢進させるメカニズムにフォーカスして次の実験に進んだという理解でよいでしょうか。

大 はい、その通りです。

中 GLP-1(Fig. 4)とアディポネクチン(Fig. 5)を調べていますが、これらをターゲットにしたのはなぜですか。

大 GLP-1に関しては、ラクトフェリンを腹腔内投与するとGLP-1が上がるという論文<sup>\*5</sup>があったのです。また、ラクトフェリンが脂質代謝でPKAを活性化することもわかっていたので、関連はありそうだと考えました。アディポネクチンに関しては、最近の心臓に関するトピックにアディポサイトカイン(メモ)があって、心臓によさそうな論文も多かつたので今回はこの二つを調べてみようと思いました。

中 そうしたら、GLP-1は血清レベルが上がっていて、アディポネクチンでは変化がなかった。なので、パステウェイとしては、PKAの上流にGLP-1があるということになると(Fig. 6)。

大 はい、その通りです。ほかにも上がっている物質はあるかもしれません、私の論文検索の範囲ではこの二つしか思いつかなかったので、今回の論文で示せたのは、そこまでです。

中 そうなると次は、経口ラクトフェリンによってGLP-1が上がるメカニズムを調べるということになると思いますが、今現在、どのように考えていますか。

大 GLP-1は小腸のL細胞から出ると言わっていて、

\*4 Identification of the protective mechanism of lactoferrin in the irradiated salivary gland. Sci Rep 2017; 7: 9753.

\*5 Maekawa Y, et al. Lactoferrin potentially facilitates glucose regulation and enhances the incretin effect. Biochem Cell Biol 2017; 95: 155-61.

## ◆ドクトル中澤のぶらり研究室探訪記

42

口から飲んだラクトフェリンは腸間膜脂肪に限局するという論文があるので、おそらく、腸間膜から小腸のL細胞に何か作用しているのではないかと考えています。

中 そうすると、L細胞を光らせるマーカーとか、GLP-1が分泌されるのを光らせるようなマーカーを使って免疫染色をやるといけそうですね。

大 ありがとうございます。私は免疫染色をやったことがないので、上司に相談してみます。

### ●●● 臨床応用するなら

中 今回の結果から、ラクトフェリンを内服してGLP-1が上がって、それがPKAに作用して心筋保護に働くのであれば、GLP-1を静注してしまったほうが簡単ではあります。内服のメリットってどこにあると考えていますか。

大 単純には痛くないので、術前の栄養療法で取り入れやすいと思います。ラクトフェリン含有のヨーグルトなんかは普通に売られていますし、もちろん投与量的には全然足りないのですが。

中 僕も先生の意見に賛成です。というのも、GLP-1を静注するとなると、臨床治験のハードルがすごく高くなる。一方で、ラクトフェリンは経口摂取できるし、すでに市販品もあるので、PMDAやFDAなどからの認可はおりやすいのではないかと想像します。なので、早く臨床に適用するには適した物質であり、投与経路だと思うのです。ただ、先行研究の結果をみると、ラクトフェリンの効果が得られるのは、虚血の15分前に投与した群と30分前に投与した群に限られて、7.5分前と60分前では効果がみられなくなっていますね。

大 そうなんです。おそらく、ラクトフェリンが腸管膜に限局しているタイミングと関係していると考えています。なので、臨床応用を考えるとき、術前の経口投与のタイミングが絞られてしまうのかも。

中 いや、ラクトフェリンが腸間膜にとどまる時間が短時間だったとしても、そこから分泌されたGLP-1の血中濃度がどれくらい維持されるかによりますから、今後、GLP-1の動態を調べていくよさそうですね。手術の前1週間をかけて反復投与することで効果があるといったデータがでてくると面白そうです。

大 はい。臨床での投与計画を意識した研究につながるといいなと思っています。実は、フラボノイドの実験もしていたのですが、あまりよい結果が出なかつたので、ラクトフェリンで結果が出たのはよかったです。

中 フラボノイド？

大 山梨はワインが有名なので。

中 なるほど。それも経腸投与ですか？

大 いや、灌流液に混ぜただけです。

中 だったら、経腸フラボノイドは効果が出るかもしれませんよ。

大 確かにそうですね。上司に相談してみます。山梨の病院は術前栄養指導でワインを勧める、なんてなったら面白いですね。

中 あと、PKAのメカニズムについては、メタボロミクスをすればいろいろわかることも多そうです。

大 実験助手さんから話は聞いたことがあります。

中 ただ、お金がかかります。それに、一発で多くのデータが得られるので、コツコツ実験して結果が出る喜びは薄くなりそうですね。僕は、いろいろなタンパク質のパスウェイの図を眺めながら、ああでもないこうでもないと考えるのが楽しいのですが、今後は、もう少しテクノロジー活用して効率的にやらないと生き残ってはいけないかもしれません。

大 勉強になります。私もこれから後輩がやってきて、研究計画を作っていくかなければいけないので、いろいろな先生方と交流してアイディアをどんどん出せるようになっていきたいと思っています。

18)

(本訪問は2024年10月25日にzoomにて行われた)

1/a ピラギ/明朝(42)  
シリウロエ

14a 新ゴL

} 指定外  
添用

1/a ロダンM  
→ベタ  
16H  
24W 説

1/a ロダンDB