

牛乳・乳製品に含まれるラクトフェリンの組織幹細胞への作用と骨質改善に関する研究

松本歯科大学総合歯科医学研究所：小澤 英浩

要 約

牛乳・乳製品には、Ca吸収や骨代謝を促す効果が知られている。牛乳等に含まれるラクトフェリン（LF）は、骨代謝機能や骨強度を高めることが報告されている。しかしながら、LFの骨代謝に関する幹細胞への効果は、詳細に検討されていないのが現状である。今回、我々は、LFの骨組織に対する効果を調べるとともに、間葉系幹細胞、造血系幹細胞への作用を検討した。マウスを用いたin vivo実験では、LF投与は、卵巣摘出したマウスにおいて、骨量減少を抑制した。そして、in vitro実験において、LF刺激は、多分化能を有する間葉系幹細胞株であるC3H10T1/2細胞の骨芽細胞分化を促進し、脂肪細胞分化を抑制した。この結果は、LF摂取により間葉系幹細胞の脂肪細胞分化が抑制されることで、骨芽細胞分化へ移行しやすい環境が調節されることを示唆している。また、破骨細胞分化誘導の実験では、共存培養系および骨髄細胞培養系、どちらにおいても、LF刺激は破骨細胞分化を抑制したが、共存培養系の方がLF濃度高レベルでその効果が得られた。このことより、LF刺激による破骨細胞分化には、造血系幹細胞に直接的に働く抑制機構と間葉系幹細胞および骨芽細胞のRANKL発現による促進機構により調節されていることが示された。すなわち、LF刺激では、造血系幹細胞に働く作用の方が優位に働くため、破骨細胞分化が抑制されたと考えられる。

以上のことより、LFは間葉系幹細胞の脂肪細胞分化を抑制することで、骨芽細胞分化に適した環境を調節する。そして、LFは破骨細胞分化を抑制することで、骨量減少を抑制し、骨質を維持することが示唆された。

緒 言

超高齢社会を迎え、加齢に伴い低下する身体的QOLをいかに維持・向上するかは、医療・福祉的視点からも社会全体の大きな問題になっている。この身体的QOLを脅かす要因として、身体機能に直接、影響を与える硬組織の機能低下、すなわち、骨や歯の欠損および喪失があげられる。その有効な治療法の一つとして再生医学が注目を集めている。これまで、硬組織形成研究、胚性幹細胞や各臓器由来組織幹細胞を用いた硬組織再生の研究が行われているのだが、いまだ完全な硬組織の再生には至っていない。よって、事前の予防が重要であることをさらに認識する必要があると考えられる。現在、その予防法として、乳製品の摂取が推進されている。牛乳・乳製品には、カルシウム、塩基性タンパク質、ラクトフェリン（LF）、カゼインホスホペプチドなどが含まれている [1]。これらはCa吸収や骨代謝を促す効果を有することが知られており、その中でもLFは、骨芽細胞の骨形成能を促し、骨強度を高めることが報告されている [1-2]。この骨代謝を司っているのは、破骨細胞と骨芽細胞である。さらに、その起源を辿ると造血系幹細胞と間葉系幹細胞になる。しかしながら、これらの幹細胞に対する牛乳・乳製品の効果は、不明な点が多い。特に

生体における検討がされていないため、いまだ骨代謝への作用のメカニズムが明確となっていない。そこで、本研究では、牛乳・乳製品に含まれるLFによる幹細胞に対する作用を検討し、LFの骨代謝への作用および骨質改善のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

実験方法

本実験は、生体に対するラクトフェリン (LF) の効果を検討するための *in vivo* 実験と細胞レベルでのLFの効果を検討するための *in vitro* 実験に分類した。なお、動物を用いた実験に関しては、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に基づいて、松本歯科大学動物実験室運営委員会による実験計画の検討と学長の承認をもって実施した。

1. 動物実験によるLFの骨量増加および骨質改善の検討

動物の処置とLFの投与

ICR マウス60匹 (5週齢、メス)のうち半分のマウスを外科的手術により、卵巣を摘出したOVX群、残りの半分を偽手術を施したSham群として、1. Sham Control (SC), 2. Sham+LF10 (SLF10), 3. Sham+LF100 (SLF100), 4. OVX Control (OC), 5. OVX+LF10 (OLF10), 6. OVX+LF100 (OLF100) の6群に分けた。これらのマウスに対し、一日一回LF 10 mg/kg BWまたは100 mg/kg BWの経口投与を5週間行った。コントロールである SCおよびOC群には、生理食塩水を投与した。その後、定期的に体重測定を行った。また、実験終了後の大腿骨の大きさ (長さ、幅、厚さ) を測定した。

骨形態計測学的解析

実験開始後、一週間毎にイソフルラン麻酔下で *in vivo* マイクロCT (R_mCT, Rigaku, Tokyo, Japan) による撮影を行った。撮影条件は、撮影倍率: 10倍、管電圧: 100 kV, 管電流: 160 μ A とした。再構成した画像を解析ソフト (i-view, Morita, Tokyo, Japan) により三次元構築した。また、実験終了時に摘出した脛骨または大腿骨をマイクロCT (ScanXmate-A080, COMSCAN TECNO CO., LTD. Yokohama Japan) により撮影した。そして、骨量解析ソフト (TRI/3D-BON, Ratoc System Engineering CO., LTD, Tokyo, Japan) を用いて骨量 (BV/TV), 骨梁幅 (Tb. Th), 骨梁数 (Tb. N), 骨梁間隙 (Tb. Sp) の骨微細構造解析を行った。さらに peripheral Quantitative Computed Tomography (pQCT; Norland/Stratec XCT Research SA+; Stratec Medizintechnik GmbH, Pforzheim, Germany) により成長板から0.5 mm の部位の骨密度 (BMD: bone mineral density) および骨塩量 (BMC: bone mineral contents) を測定した。

組織化学染色による解析

実験開始2週目に各群のマウス (n=3) を4% パラホルムアルデヒドで灌流固定を行った後、後肢を採取した。そして、試料をEDTA-2Na溶液で1週間、脱灰した後、パラフィンブロックにし、パラフィン切片を作製した。そのパラフィン切片をtartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色により破骨細胞を選択的に染色した。

2. 細胞培養実験によるLFの細胞機能に与える作用の検討

細胞増殖に与えるLFの作用

間葉系幹細胞株(C2C12, C3H10T1/2, ST2 細胞)、マウス骨髄由来間葉系細胞(BMSCs: bone marrow stromal cells)、マウス頭蓋冠由来骨芽細胞 (OB) 5×10^2 cells/well を96-well plateに播種した後、LF (0.1-1000 $\mu\text{g/ml}$)を添加し、アラマーブルー法で細胞増殖を調べた。

間葉系幹細胞の分化能に対するLFの効果

骨芽細胞分化に与える作用を調べるために、C3H10T1/2 細胞およびBMSCs 1×10^4 cells/well を48-well plateに播種した後、10% FBS含有 α -MEM培地に1 μM Dexamethason, 10 mM β -glycerophosphate, 0.2 mM ascorbic acidを加えたものを骨芽細胞分化誘導培地として用いた。さらに、LF (0.1-1000 $\mu\text{g/ml}$)を加えて、7日間培養した後、alkaline phosphatase (ALPase) 染色を行った。また、骨芽細胞分化に伴う遺伝子発現 (alpace, runx2: runt-related transcription factor, rankl: receptor activator of NF- κ B ligand) をreverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)により解析した。

脂肪細胞分化に与える作用を調べるために、C3H10T1/2細胞 1×10^4 cells/well を48-well plateに播種した後、10% FBS含有 α -MEM培地に1 μM dexamethasone, 0.1 mM indomethacin, 0.01 mg/ml insulin, 0.5 mM 3-isobutyl-1- methyl-xanthineを加えたものを脂肪細胞分化誘導培地として用いた。さらに、LF (0.1-1000 $\mu\text{g/ml}$)を加えて、14日間培養した後、Oil red O 染色で脂肪細胞を染色した。脂肪細胞数は、顕微鏡下で計測された。また、脂肪細胞分化に伴う遺伝子発現 (ppary: peroxisome proliferators -activated receptor) をRT-PCRにより解析した。プライマーは、以下のものを使用した。

gapdh, AACTTTGGCATTGTGGAAGG/ACACATTGGGGGTAGGAACA (23 cycles, product size: 223 bp); alpace, GCTGATCATTCCCACGTTTT/CTGGCCTGGTAGTTGTTGT (35 cycles, product size: 204 bp); osterix, GAAGTCCAATGGGGATCTGA/AGAATCCCTTTCCCTCTCCA (37 cycles, product size: 189 bp); PPAR γ , TATGGAGTTCATGCTTGTGA/ CGGGAAGGACTTTATGTATG (25 cycles, product size 315 bp).

造血系幹細胞の破骨細胞形成に対するLFの効果

破骨細胞分化に与える作用を調べるために、マウス骨髄細胞培養系と共存培養系を適用した。

共存培養系: ddy マウス (5 wk, 雄)の脛骨より骨髄を採取し、 1×10^6 cells マウス頭蓋骨由来骨芽細胞を加え、1 μM prostaglandin E2, 10 nM 1μ , 25 (OH)2D3 を加えた α -MEM培地で7日間培養した。3日ごとに培地交換を行った。

マウス骨髄細胞培養: ddy マウス (5 wk, 雄)の脛骨より、骨髄を採取した後、50 ng/ml M-CSFを加えた 10% FBS α -MEM培地で培養した。16時間後、非接着細胞である造血系細胞を回収し、 1.5×10^5 cells/wellになるように46-well plateに播種した。3日間、50 ng/ml M-CSF, LF (0.1-1000 $\mu\text{g/ml}$) で培養した後、100 ng/ml RANKL, 50 ng/ml M-CSF, LF (0.1-1000 $\mu\text{g/ml}$)を添加して、さらに4日間培養した。

統計学的解析

実験によって得られたデータは、mean ± SD で表記し、さらにStudent's T-testおよび ANOVA を用いて、有意差検定を行った。危険率が0.05 以下の場合を有意差として認めた。

結果

1. 動物実験によるLFの骨量増加および骨質改善の検討

1) LF経口投与による体重変化

Sham群、OVX群ともにLFを投与することで、体重増加が抑制された。特に、Sham群では、投与して2週目にControl群と投与群の間に有意な差が認められた (図1)。OVX処置群では、OLF10で4週目以降に有意な差が認められた (図1)。

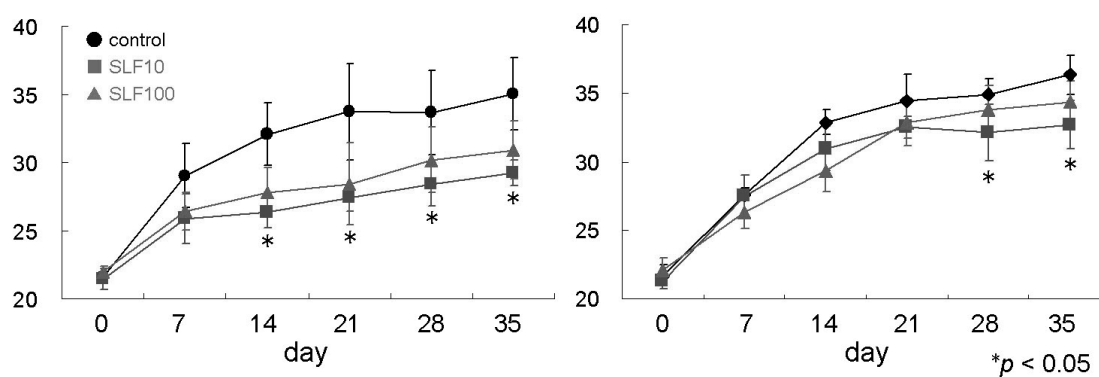


図1. Sham群とOVX群に対するLFによる体重変化

2) 骨の成長に与えるLFの作用

骨の成長の指標として、大腿骨長、幅、および厚さを計測した結果、Sham群およびOVX群において、大きな差は認められなかった (表1)。

表 1. 実験終了時の骨の大きさ

	Length (mm)	Wide (mm)	Thickness (mm)		Length (mm)	Wide (mm)	Thickness (mm)
SC	16.64±0.40	1.91±0.15	1.54±0.06	OC	16.87±0.29	1.82±0.08	1.48±0.07
SLF10	16.05±0.50	1.83±0.11	1.53±0.04	OLF10	16.27±0.26	1.87±0.04	1.53±0.08
SLF100	17.13±0.87	1.90±0.07	1.56±0.13	OLF100	16.72±0.52	1.83±0.05	1.47±0.02

3) 骨形態計測学的解析

① 実験終了時の骨を用いた解析

LFは、sham群の骨量に大きな差を与えなかった。一方、OVX群にLFを投与することで、非投与よりも高値の骨量が得られた。OLF10, OLF100ともに、OCと比し、有意に増加した(図2)。その他の形態計測学的解析により、Tb. ThおよびTb. NでOLF10, OLF100は有意に高値であり、Tb. Spでは、低値が示された(表2)。

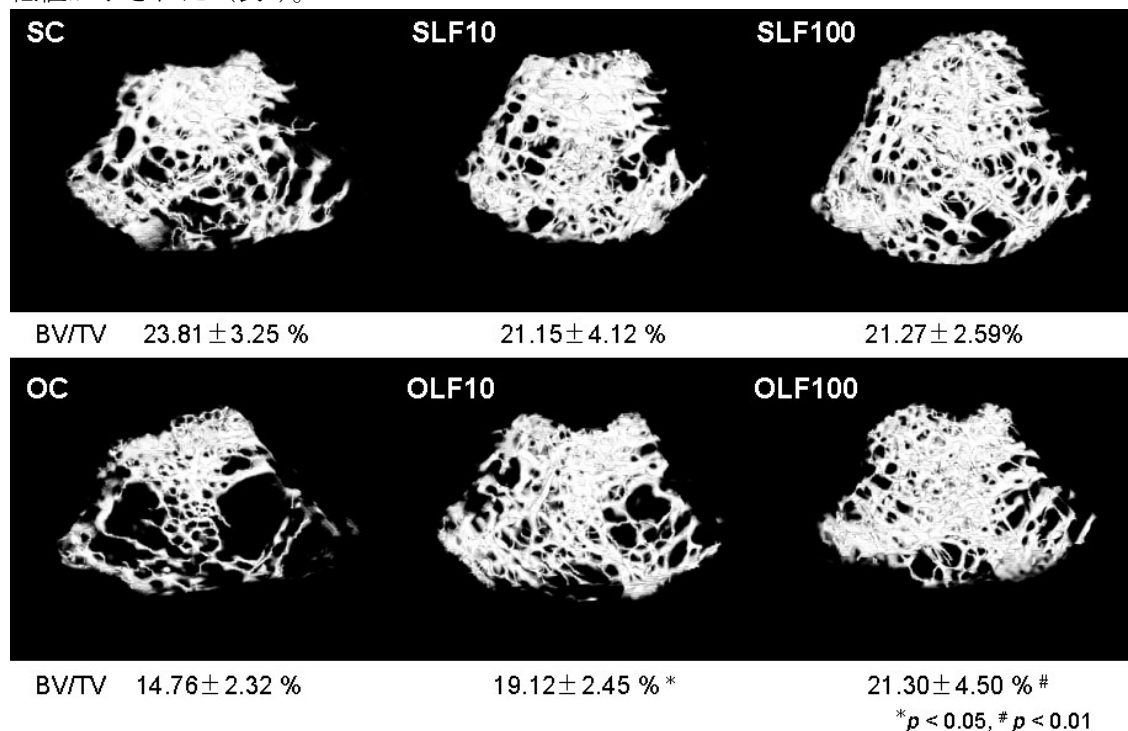


図2 実験終了時(4週目)の骨量

表2 実験終了時(4週目)の骨形態計測学的解析

	SC	SLF10	SLF100
Tb.Th	41.51 ± 0.33	38.47 ± 0.96	35.72 ± 2.29 *
Tb.N	4.28 ± 0.23	4.89 ± 0.82	4.74 ± 0.19
Tb.Sp	192.37 ± 12.26	170.04 ± 37.06	175.68 ± 6.49
	OC	OLF10	OLF100
Tb.Th	35.55 ± 2.21	39.61 ± 2.88 *	38.61 ± 1.04
Tb.N	2.81 ± 0.14	4.07 ± 0.69 *	4.13 ± 0.41 *
Tb.Sp	321.19 ± 19.15	212.18 ± 51.28 #	205.03 ± 23.82 #

*p < 0.05, # p < 0.01

BMDは、Sham群では、LF投与による大きな差が見られなかったが、OVX群のBMDは、OVX, OLF10, OLF100の順に、256 ± 50.85, 390 ± 60.02, 336 ± 37.19 mg/cm³であり、OVXと比し、有意な差が得られた。同様に、BMCにおいても、OVX, OLF10, OLF100は、それぞれ0.56 ± 0.39, 0.81 ± 0.16, 1.17 ± 0.18 mg/cm³であり、OVXLF10, OVXLF100ともにOVXと比し、有意な高値を示した。

② in vivo マイクロCTを用いた評価 (図3)

Sham群においては、LF投与による違いは見られなかった。しかしながら、実験の経過とともに海綿骨の骨量低下が観察された。一方、OVX処置をすることで、成長板直下の骨梁が消失して骨量が著しく低下するのに対し、LFを投与すると、海綿骨における骨量低下が抑制された。特にOLF100では、実験経過とともに骨量低下が見られるものの、その低下は僅かなものであった。

4) 組織化学的解析：破骨細胞におよぼすLFの作用 (図4)

前述の所見より、LFは、Sham群の骨に対しては大きな影響を与えなかった。そして、OVX処置群の骨に対して作用することから、評価の対象をOVX群に絞った。

TRAP陽性細胞（赤色の細胞）である破骨細胞は、全群の骨表面に観察された。破骨細胞は、LFを投与することで、細胞数が減少した。また、OC群の破骨細胞は、骨基質に接着し丸みを持っていた。それに対し、OLF10群では、破骨細胞は骨基質面で扁平状の形態を有していた。そして、OLF群では、OLF10群と同様に扁平状に加え、小型化した破骨細胞が多く観察された。

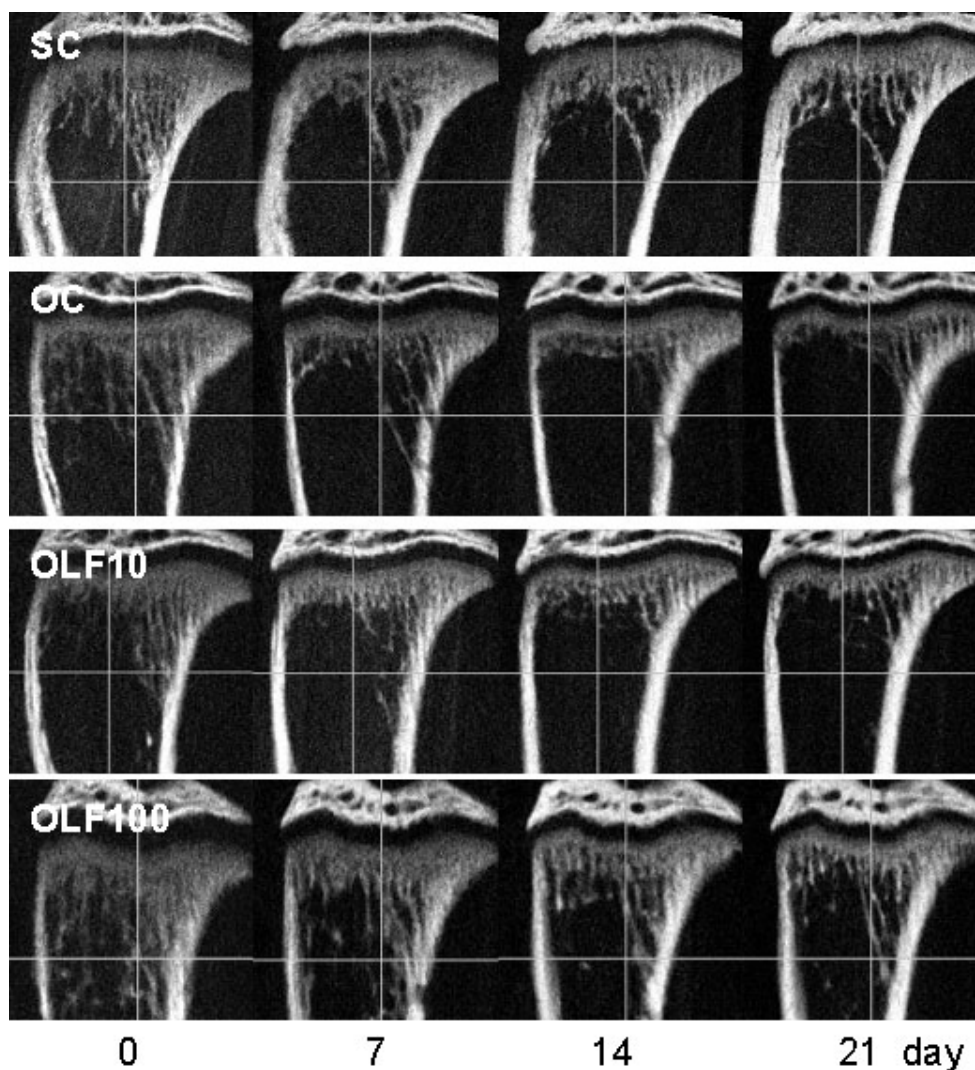


図3. in vivo マイクロCTを用いた海綿骨の骨量変化

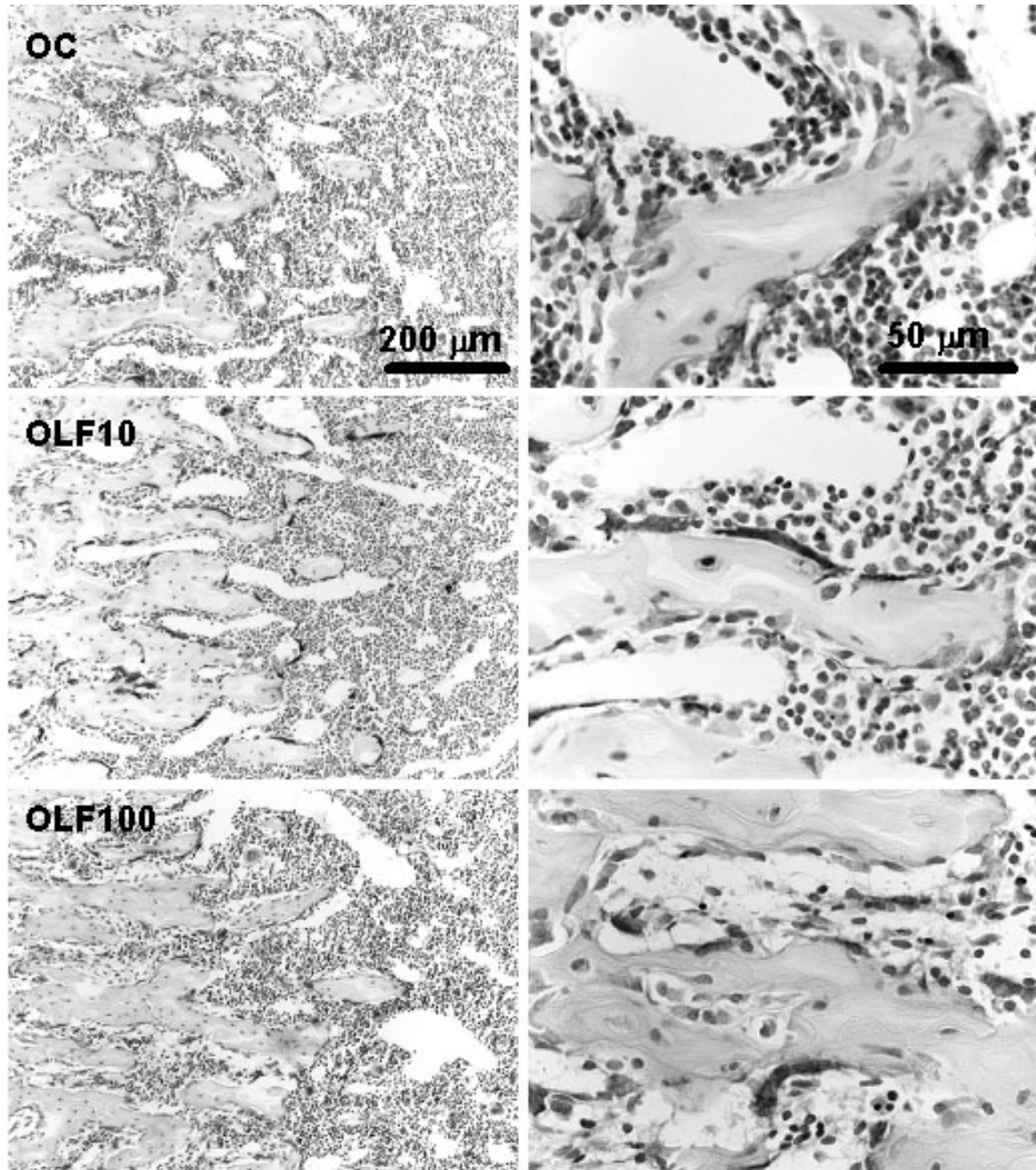


図4 TRAP染色による破骨細胞の評価

2. 細胞培養実験によるLFの細胞機能に与える作用の検討

1) 細胞増殖に与えるLFの作用 (図5)

間葉系幹細胞株であるC3H10T1/2細胞、C2C12細胞、ST2細胞、さらにBMSCsとOBの細胞増殖をアラマーブルーアッセイにより計測した。間葉系幹細胞株およびBMSCsは、いずれのLF濃度においても、コントロール(LF 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)と比べて、大きな差は認められなかった。一方、OBではLF1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を添加することで、培養4日目以降に細胞増殖能の低下が認められた。これらの事より、LF高濃度でOBの細胞増殖を阻害するが、間葉系幹細胞の増殖能にLFは、影響をおよぼさないことが示された。

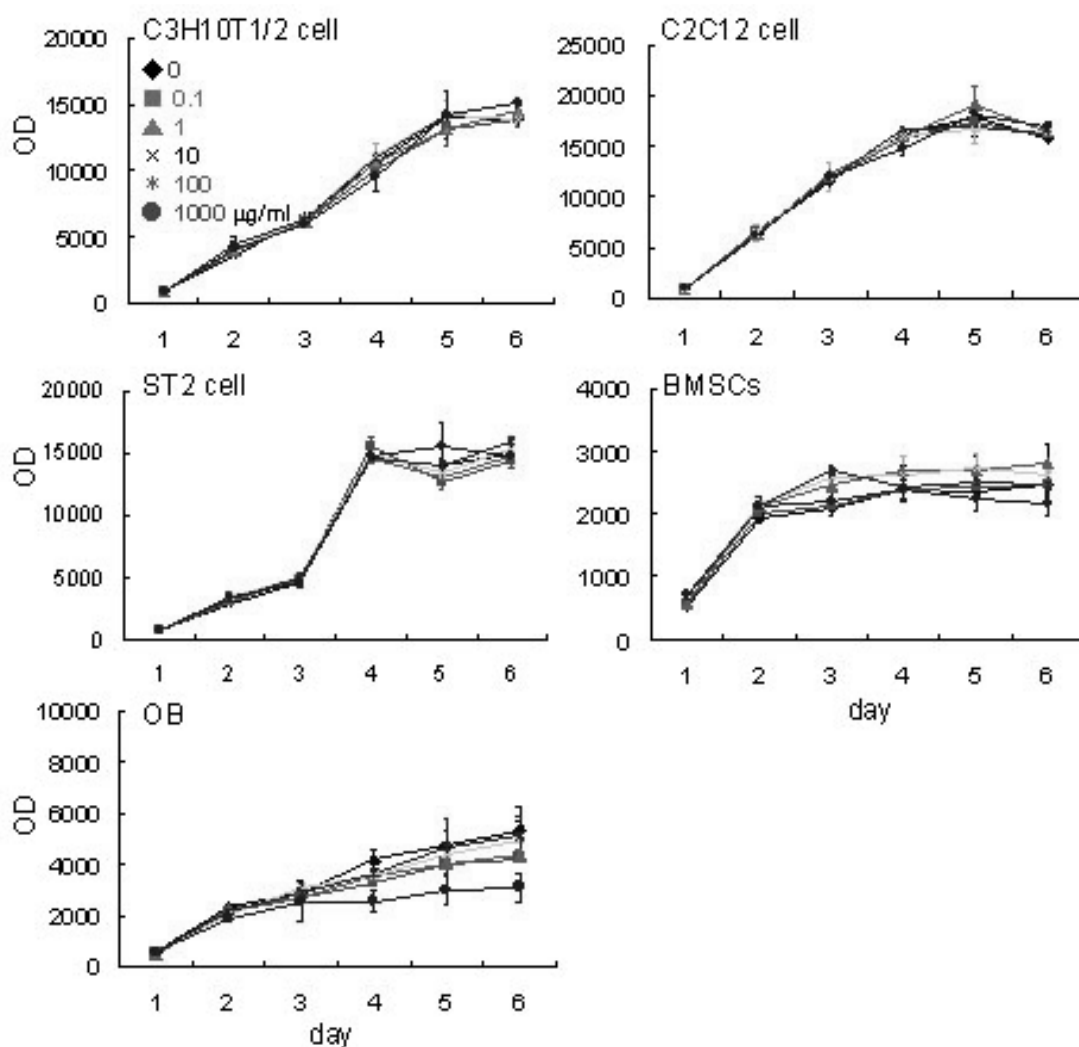


図5. 諸細胞の増殖能に対するLFの作用

2) 間葉系幹細胞の分化能に対するLFの効果

① 骨芽細胞分化誘導に与える作用

in vivoの実験より、骨量低下を抑制することから、LFの骨形成能を検討するために、C3H10T1/2細胞およびBMSCsの骨芽細胞への分化能に与えるLFの作用を調べた。評価法には、骨芽細胞の分化マーカーとして知られるAlkaline phosphatase (ALPase) を指標とした。C3H10T1/2細胞は、LF非添加ではALPase陽性細胞数は少ないが、LF刺激により、その数が増加した。LF10 $\mu\text{g/ml}$ をピークに濃度依存的にALPase陽性細胞が増加した。また、BMSCsにおいても同様にLF10または100 $\mu\text{g/ml}$ をピークにALPase陽性細胞が増加した (図6)。また、RT-PCRによる遺伝子発現の解析においても、LF刺激によりALPaseの発現が亢進した。そして、骨芽細胞の核内転写因子であるrunx2および骨芽細胞が発現するRANKLにおいても、LF刺激により発現量が増加した (図7)。

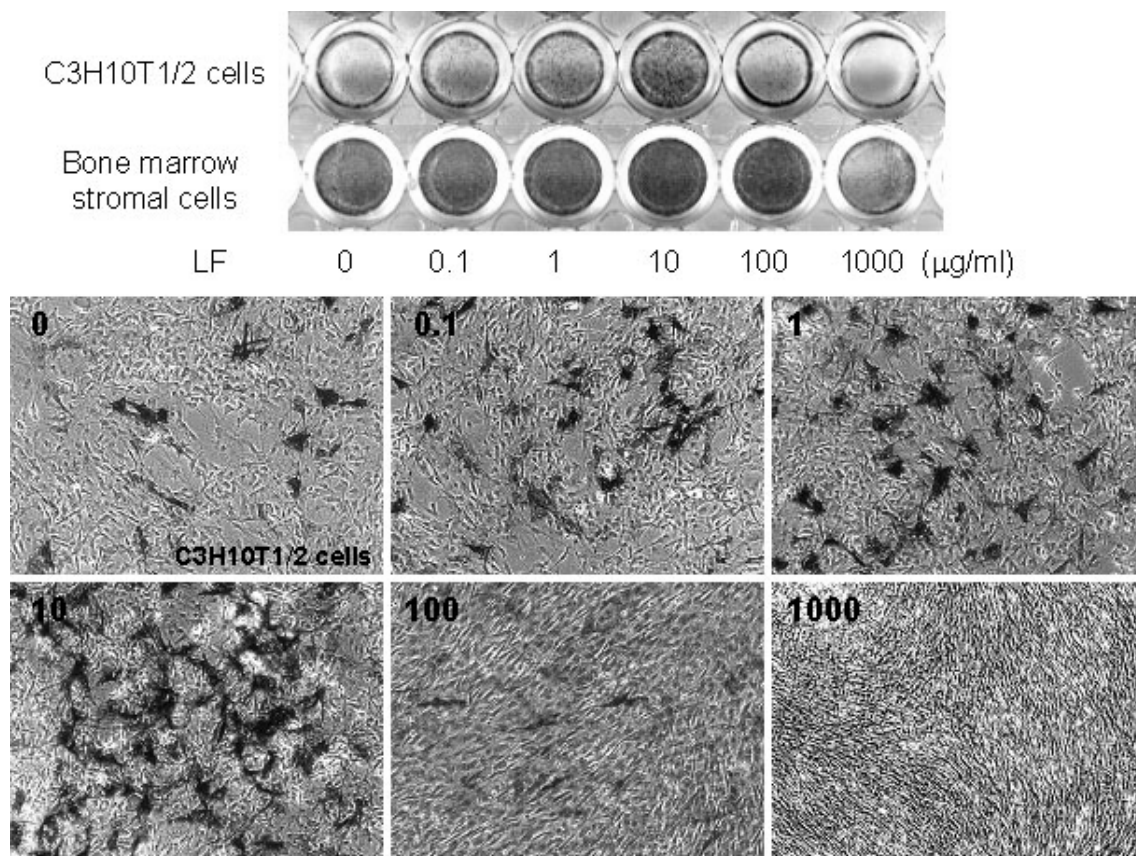


図6 LF刺激による骨芽細胞分化促進作用

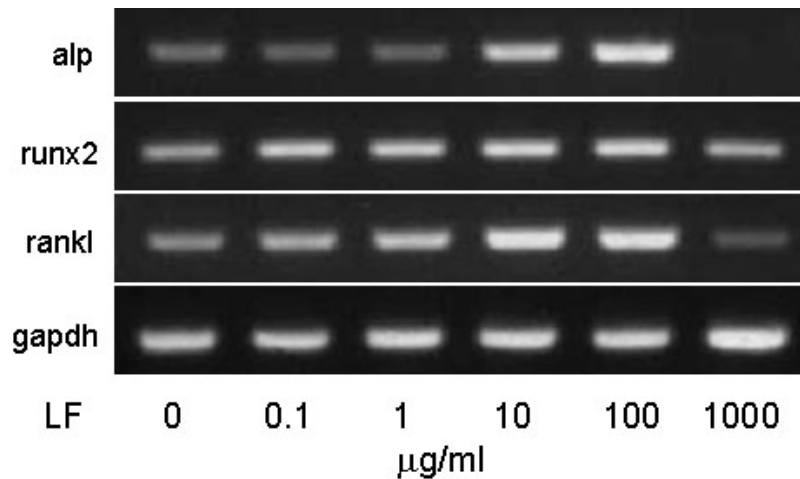


図7. LF刺激による骨芽細胞分化のRT-PCRによる解析

② 脂肪細胞分化に与える作用

LFの間葉系幹細胞の脂肪細胞分化に与える作用を調べるために、骨芽細胞分化に関する実験と同様にC3H10T1/2細胞を用いた。

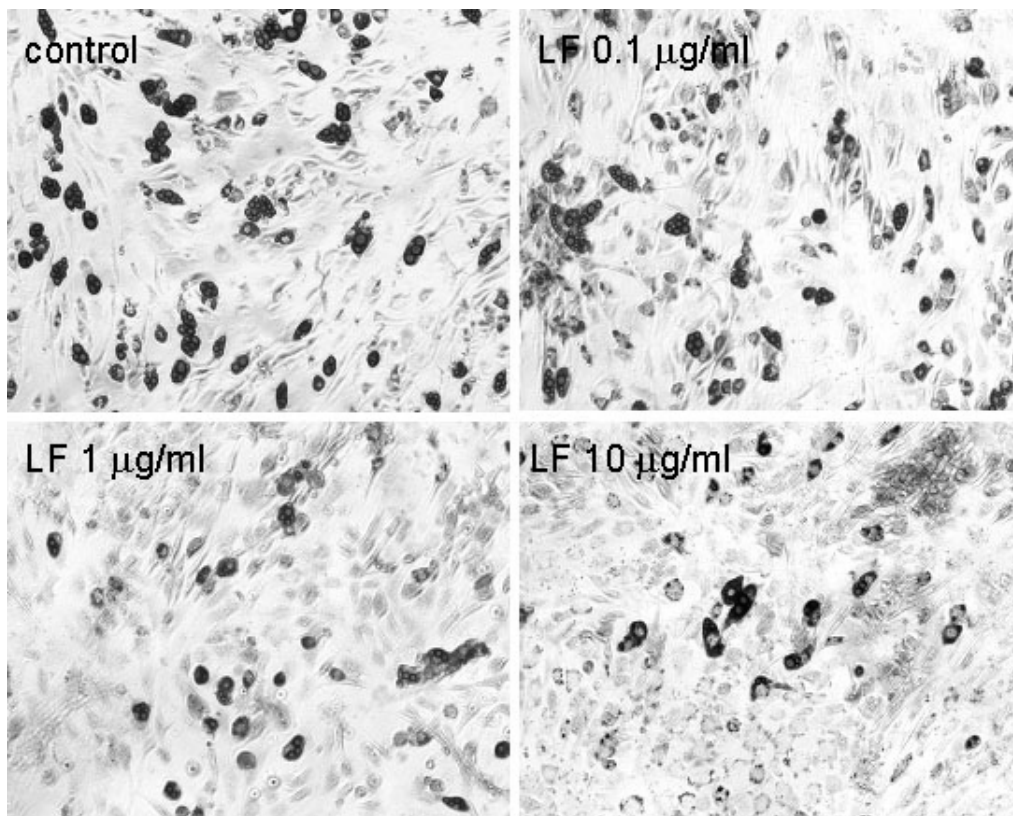


図8. A. LF刺激による脂肪細胞分化抑制作用

C3H10T1/2細胞は、LF無添加の脂肪細胞誘導培地で培養することで、細胞質に脂肪滴を持つ脂肪細胞に分化した。一方、LFを添加すると濃度依存的に分化が抑制され、LF 1 µg/ml で有意差が認められた。LF 100 µg/ml以上の濃度では、脂肪細胞は形成されなかった (図8. A, B)。

脂肪細胞には、核内受容体型の転写因子ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (ppary) を特異的に発現する。この遺伝子をRT-PCRにより検索した (図9)。ppary遺伝子発現もまた、脂肪細胞分化実験の結果と一致して、LF濃度依存的に抑制された。

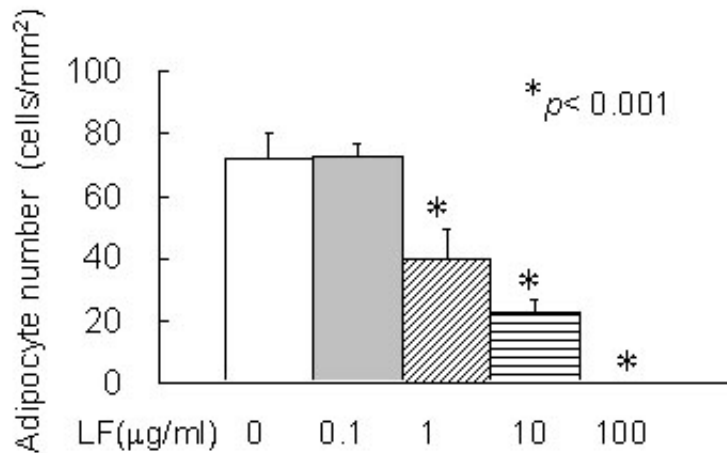


図8. B. LF添加により形成された脂肪細胞数 (n=5)

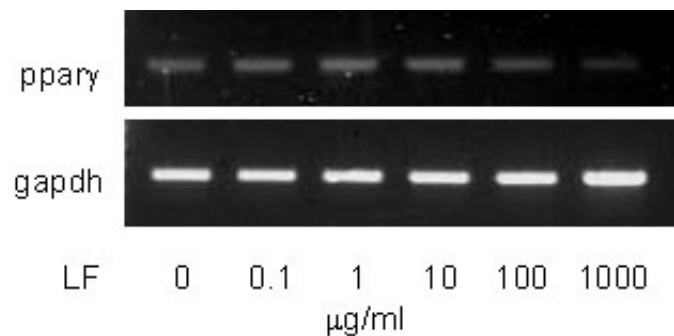


図9. LF 添加によるppar γ 遺伝子発現の抑制

3) 造血系幹細胞の破骨細胞形成に対するLFの効果

① 共存培養による破骨細胞形成に与えるLFの作用 (図10. A, B, C)

共存培養は、造血系細胞と間葉系細胞または骨芽細胞が共存するため、間葉系細胞や骨芽細胞のRANKL発現によって破骨細胞分化が促される。コントロール (LF 0 $\mu\text{g/ml}$) では、破骨細胞の特徴である巨細胞の形態を呈していたが、LF刺激により破骨細胞の大きさは小さくなり、LF濃度 10 $\mu\text{g/ml}$ で有意な破骨細胞数の減少が認められた。また、LF濃度100 $\mu\text{g/ml}$ では、多核TRAP陽性細胞が存在したが、破骨細胞特有の大きさを有した細胞はほとんど見られなかった。そして、LF濃度1000 $\mu\text{g/ml}$ になると、TRAP陽性多核細胞は存在しなかった。以上のことより、LFは、破骨細胞分化を抑制する働きを有することが示された。

② 骨髄細胞培養による破骨細胞形成に与えるLFの作用 (図11. A, B, C)

本実験では、間葉系細胞を除去し造血系細胞のみを採取して実験を行った。よって、本実験では、造血系細胞のみに対するLFの作用を検討した。

骨髄細胞培養においても、共存培養と同様な結果が得られた。しかしながら、破骨細胞形成の有意な減少は、LF濃度1 $\mu\text{g/ml}$ で認められた。以上のことより、LFは、骨芽細胞や間葉系細胞を介さず、直接的に破骨細胞形成を抑制することが明らかになった。

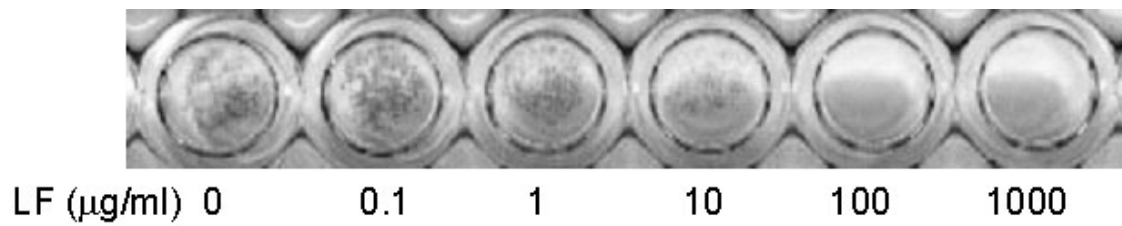


図10. A. 共存培養におけるLF刺激による破骨細胞分化抑制

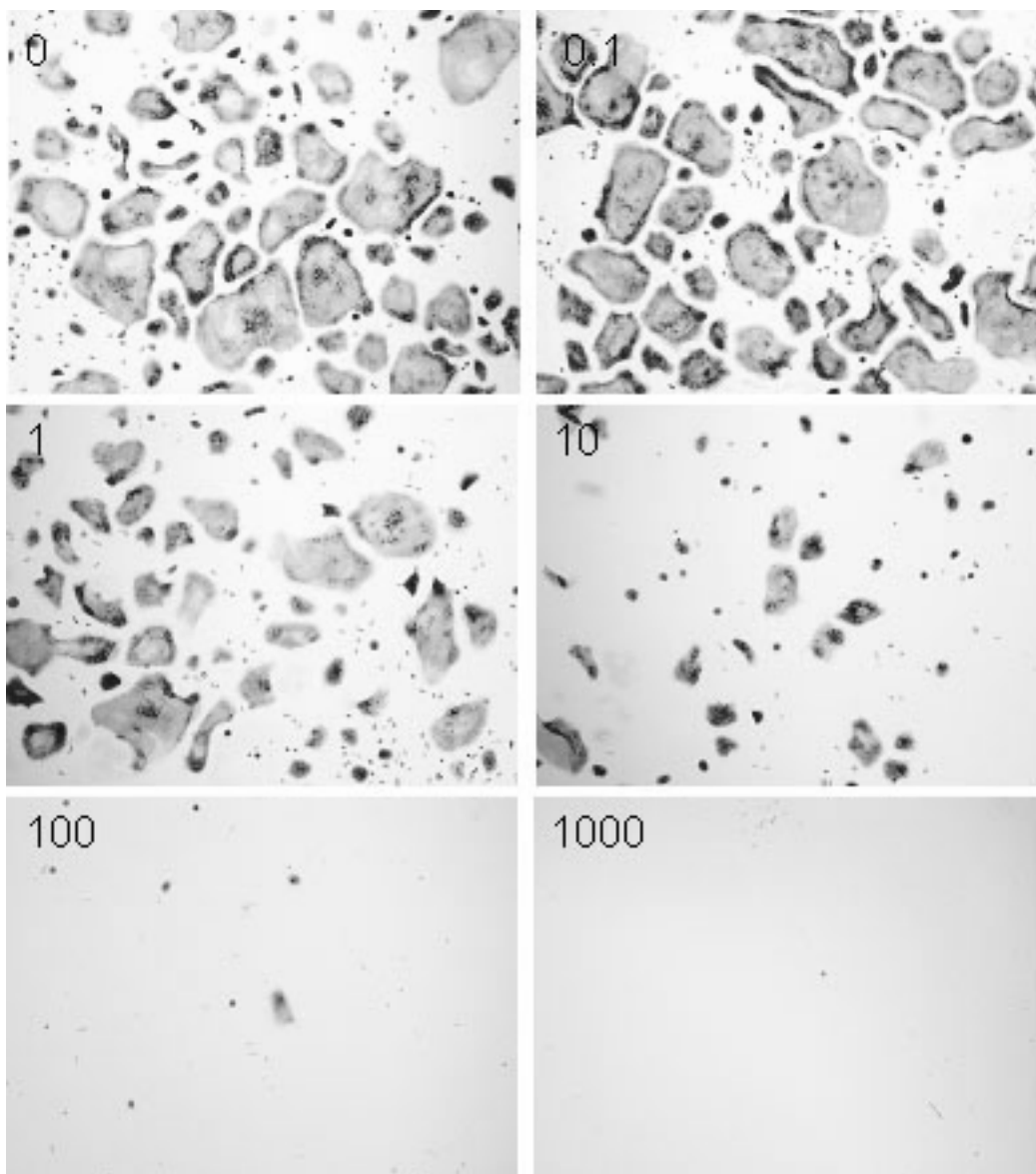


図10. B. 共存培養におけるLF刺激による破骨細胞分化抑制 (図9. A強拡大)

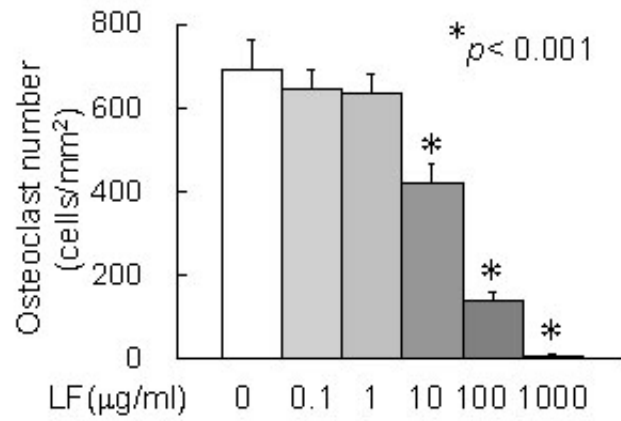


図10. C. 共存培養における破骨細胞数 (n=5)

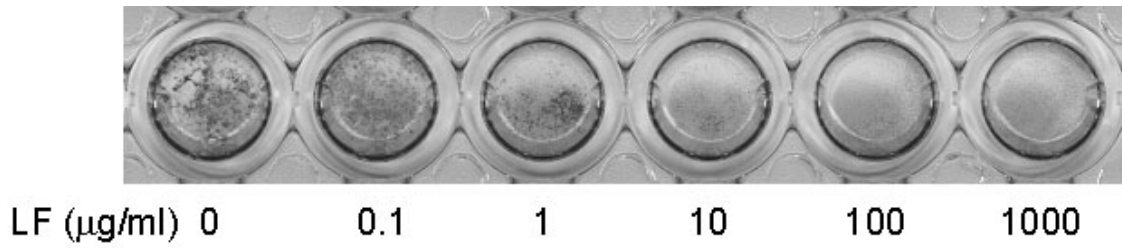


図11. A. 骨髓細胞培養におけるLF刺激による破骨細胞分化抑制

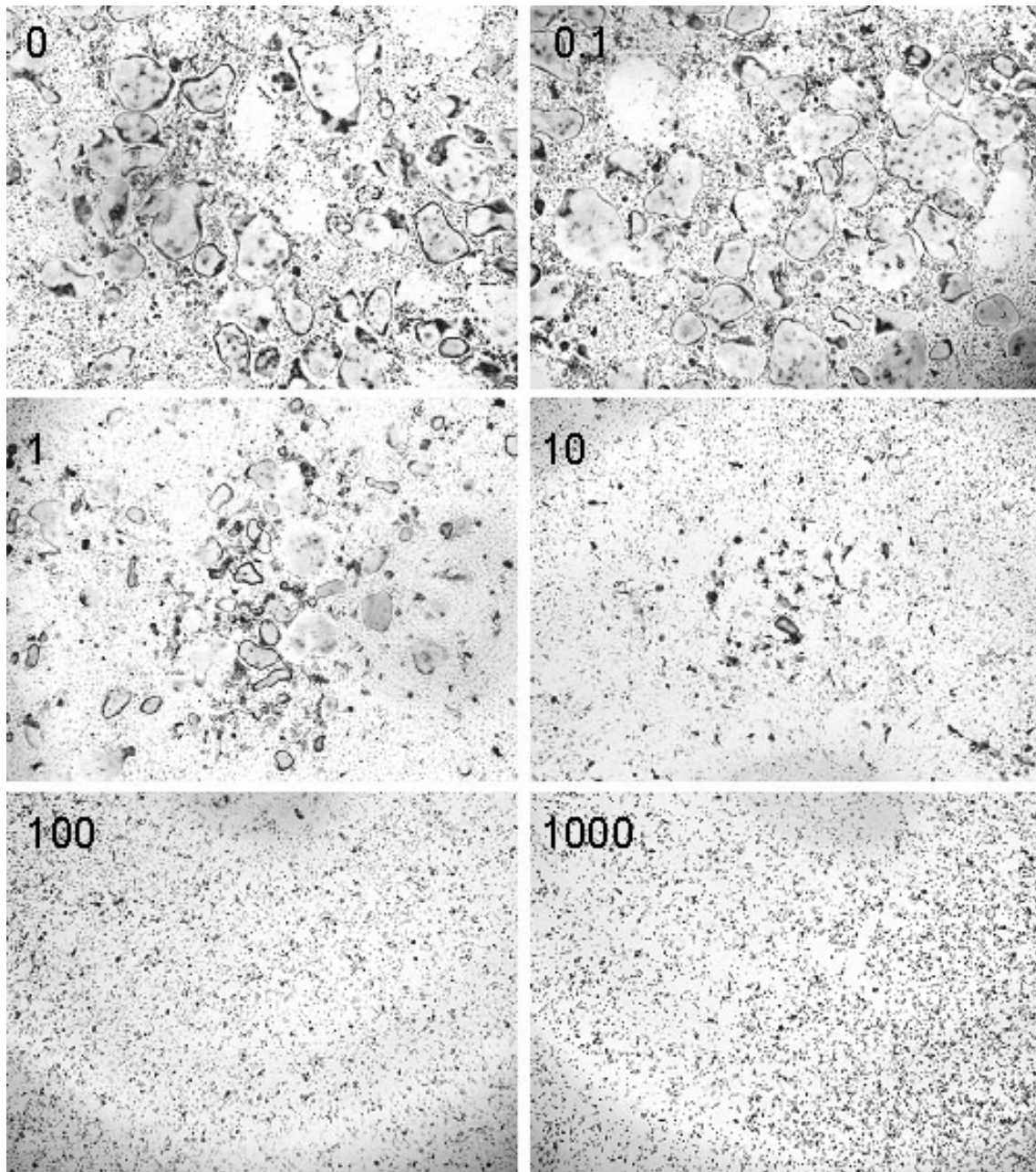


図11. B. 骨髄細胞培養におけるLF刺激による破骨細胞分化抑制 (図10. A強拡大)

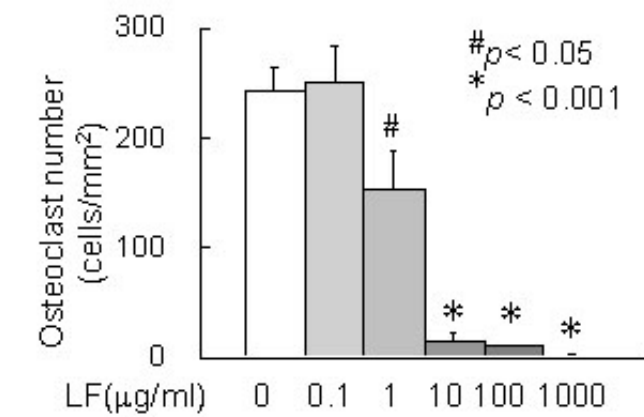


図11. C. 骨髄細胞培養における破骨細胞数 (n=5)

考 察

本実験では、卵巣摘出マウスに対してLactoferrin経口投与が骨量低下を抑制し、骨質を改善することを示した。その抑制作用には、破骨細胞の分化と機能の低下が関与していることが明らかになった。これらのことより、LF投与によってOVXに伴う骨粗鬆症の骨質低下が改善されることが示された。また、LFの細胞に対する作用として、*in vitro*実験で検討された。間葉系幹細胞に対する作用は、骨芽細胞分化を促進し、脂肪細胞分化を抑制する。そして、骨髄由来造血系幹細胞の破骨細胞分化を抑制することが明らかになった。

これまでにOVXマウスに対するLF経口投与の骨量減少抑制作用に関して、形態計測学および生化学的に評価されている [3-4]。しかしながら、*in vivo*における細胞レベルでの評価はなされておらず、LFの骨代謝に対する作用機序に関しては、検討されていない。今回、我々は、LFによる破骨細胞分化の抑制作用に関して、*in vivo*において明らかにした。LF投与により破骨細胞形成は抑制されており、さらに、破骨細胞の形態に作用を与えていた。通常の破骨細胞は活性化しているため、OCのように丸みを帯びているのだが、LF投与群では扁平状であった。このことからLFは、破骨細胞を機能的にも低下させることが推測された。そして、*in vitro*実験においても、造血系細胞にLFを添加することで、破骨細胞分化が抑制された。これらのことより、LF経口投与による骨量低下抑制作用は、破骨細胞の分化抑制と機能低下であることが示唆された。一方、骨形成に関して、マウス頭部にLFを直接投与することで、骨形成が亢進されることが報告されている [5]。骨芽細胞には、lipoprotein receptor-related protein-1, 2 (LRP1, LRP2)が発現しており、その部位にLFが結合し、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれると考えられている [6]。我々は、*in vitro*実験において、間葉系幹細胞の骨芽細胞分化が促進されることを示した。この結果は、LFの骨形成能促進作用を支持するものである。しかしながら、これまでのLFの骨形成作用に関しては、動物に対する局所的な投与もしくは*in vitro*実験による所見であるため、今後、経口投与による*in vivo*実験の検討が必要であると考えられる。

間葉系幹細胞は、多分化能を有しており、成長因子によって、骨芽細胞、脂肪細胞、線維芽細胞、筋芽細胞などに分化することができる。すなわち、骨芽細胞は、脂肪細胞と同じ前駆細胞から分化することが知られている [7]。この前駆細胞は、常にバランスが保たれており、骨芽細胞分化と脂肪細胞分化においては、逆の相関を持っている [8-9]。本実験において、LF刺激は間葉系幹細胞の骨芽細胞分化を促進したが、脂肪細胞分化を抑制した。これら所見は、生体における骨芽細胞と脂肪細胞の関係と一致しており、間葉系幹細胞の分化方向がLFにより骨芽細胞へ誘導されることを示している。これらのことより、LFは間葉系幹細胞を調節し、骨形成促進の機能を有することが示唆された。

破骨細胞分化には、骨芽細胞が発現するRANKLが重要な働きを担っている。破骨細胞前駆細胞は、RANKLの受容体であるRANK (receptor activator of NF- κ B) を発現し、細胞間接触機構でRANKLを認識し、破骨細胞に分化する [10-11]。In vitro実験において、LF刺激により間葉系細胞のRANKL発現が亢進した。この所見より、破骨細胞分化においても、LF刺激は亢進させることで高代謝回転になることが予想された。しかしながら、骨芽細胞および間葉系細胞が存在する共存培養にお

いて、LF刺激により破骨細胞分化は抑制された。さらに、間葉系細胞を除去した骨髄細胞培養系においても、LF刺激は破骨細胞分化を抑制していた。これらは、LF刺激による破骨細胞分化抑制作用が、RANK/RANKL機構とは異なる機序であり、造血系幹細胞に対して直接的に働くことを示唆している。また、骨髄細胞培養系における破骨細胞分化抑制は、LF濃度1 $\mu\text{g/ml}$ で有意差が認められたのに対し、共存培養系では、LF濃度10 $\mu\text{g/ml}$ であった。この所見より、LFはRANK/RANKL機構により破骨細胞分化を誘導するが、造血系幹細胞に直接的に働く抑制作用の方が優位に働いていると考えられる。

LFを摂取すると、体内でその一部がペプシン消化によって切断され、強い抗菌活性を持つ Lactoferricin (LFcin)を産生することが知られている [12]。これまでに、LFcinはグラム陰性菌、糸状菌、寄生原虫などの微生物の増殖を抑制 [13]、また、ヒト結腸癌由来株化細胞であるCaco-2細胞の増殖を抑制することが報告されている [14]。これらのように、抗菌作用や抗癌作用に関して多くの報告があるのに対し、骨代謝に関わる報告は皆無である。本実験では、LFの作用を *in vivo*, *in vitro*で検討することが目的であったため、LFcinの骨代謝への作用は実験項目より外した。しかしながら、LFもまた、LFcinと同じ抗菌作用を持つという類似した特徴を有することから、LFcinの骨代謝への作用も検討が必要かもしれない。

本研究では、LFが、① 間葉系幹細胞の脂肪細胞分化を抑制 ② 間葉系幹細胞の骨芽細胞分化を促進③ 造血系幹細胞の破骨細胞分化を抑制することで、骨粗鬆症モデルマウスの骨量低下を抑制することを明らかにした。これらにより、LFによる破骨細胞分化調節に働く機序および間葉系幹細胞の脂肪細胞と骨芽細胞への分化調節について、明確にされた。本研究で得られた所見は、LFが骨粗鬆症などによる骨量低下を予防するために効果的であることを示している。

参考文献

- [1] Uenishi K. [Prevention of osteoporosis by foods and dietary supplements. Prevention of osteoporosis by milk and dairy products]. *Clin Calcium* 2006;16: 1606- 14.
- [2] Cornish J, Callon KE, Naot D, Palmano KP, Banovic T, Bava U, Watson M, Lin JM, Tong PC, Chen Q, Chan VA, Reid HE, Fazzalari N, Baker HM, Baker EN, Haggarty NW, Grey AB, Reid IR. Lactoferrin is a potent regulator of bone cell activity and increases bone formation in vivo. *Endocrinology* 2004;145: 4366-74.
- [3] Blais A, Malet A, Mikogami T, Martin-Rouas C, Tome D. Oral bovine lactoferrin improves bone status of ovariectomized mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;296: E1281-8.
- [4] Guo HY, Jiang L, Ibrahim SA, Zhang L, Zhang H, Zhang M, Ren FZ. Orally administered lactoferrin preserves bone mass and microarchitecture in ovariectomized rats. *J Nutr* 2009;139: 958-64.
- [5] Naot D, Grey A, Reid IR, Cornish J. Lactoferrin--a novel bone growth factor. *Clin Med Res* 2005;3: 93-101.
- [6] Grey A, Banovic T, Zhu Q, Watson M, Callon K, Palmano K, Ross J, Naot D, Reid IR, Cornish J. The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 is a mitogenic receptor for lactoferrin in osteoblastic cells. *Mol Endocrinol* 2004;18: 2268-78.
- [7] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002;418: 41-9.
- [8] Beresford JN, Bennett JH, Devlin C, Leboy PS, Owen ME. Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *J Cell Sci* 1992;102 (Pt 2): 341-51.
- [9] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284: 143-7.
- [10] Katagiri T, Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis* 2002;8: 147-59.
- [11] Kobayashi Y, Udagawa N, Takahashi N. Action of RANKL and OPG for osteoclastogenesis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2009;19: 61-72.
- [12] Tomita M, Wakabayashi H, Yamauchi K, Teraguchi S, Hayasawa H. Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: production and applications. *Biochem Cell Biol* 2002;80: 109-12.
- [13] Wakabayashi H, Takase M, Tomita M. Lactoferricin derived from milk protein lactoferrin. *Curr Pharm Des* 2003;9: 1277-87.
- [14] Freiburghaus C, Janicke B, Lindmark-Mansson H, Oredsson SM, Paulsson MA. Lactoferricin treatment decreases the rate of cell proliferation of a human colon cancer cell line. *J Dairy Sci* 2009;92: 2477-84.