

氏名	まつ かわ やす ひさ 松 川 泰 久
学位の種類	博士 (薬学)
学位記番号	論薬博第 708 号
学位授与の日付	平成 16 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	ラット肺胞培養上皮細胞層における蛋白質の吸収機構に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 乾 賢一 教授 高倉喜信 教授 中山和久

### 論文内容の要旨

肺は呼吸を司る臓器として大変重要であるが、近年、薬剂的観点からペプチドや蛋白質の新たな吸収ルートとしても注目を集めている。従って、これら薬物の経肺吸収機構を正確に捉えることは、医薬品の有効且つ安全な臨床使用を考える上で重要である。しかしながら、肺組織は解剖学的に極めて複雑な構造を有するため、これまでの肺全体や単離組織を用いた *in vivo* や *in situ* の手法による研究では、細胞レベルの詳細な検討を行うことができない。Kimらにより開発されたラット肺胞の Type II 細胞の初代培養上皮細胞層 (Rat Alveolar Epithelial Cell Monolayer ; RAECM) は、培養過程で Type I 様の細胞層に分化し、肺胞上皮の構造的特徴と生理機能を再現している。そこで、RAECM が蛋白質の吸収機構を明らかにする上で有用な *in vitro* 評価系であると考え、吸収機構の解明を企図して本研究を実施した。

#### I. ラット肺胞培養上皮細胞層の物理化学的特性

RAECM は厚さが  $1 \mu\text{m}$  以下の薄い扁平上皮細胞により構成されているにもかかわらず、非常に高いバリアー能を有している。そこで、種々の分子量の蛍光標識デキストランの透過性を検討し、透過障壁となる tight junction の物理化学的特性および水溶性物質の透過機構の解明を試みた。また、拡散理論に基づく equivalent pore 理論解析から tight junction の細孔径とその分布を推定した。その結果、分子量 4 万以下の水溶性物質は、分子量に依存した透過速度で拡散により RAECM を透過することが示された。また、tight junction は、 $0.4 \text{ nm}$  と  $8 \text{ nm}$  の 2 種の径を有する細孔により近似されることが明らかとなった。一方、分子量 7 万以上の水溶性物質は、分子径が大きくなり細孔中を拡散により透過することが困難となること、透過速度がほぼ一定値となること、さらに、透過性が温度に依存することから主として液性エンドサイトーシスにより輸送されることが示唆された。

#### II. ラット肺胞培養上皮細胞層における蛋白質の輸送特性

様々なペプチドおよび蛋白質の経肺および経気道吸収性が *in vivo* 実験によって検討され、蛋白質間で吸収性が大きく異なることが示されている。その原因としては、蛋白質の分子量や代謝に対する感受性の差異が寄与するものと考えられるが、詳細について検討した例は少ない。そこで、cytochrome c, granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), ovalbumin (OA), bovine serum albumin (BSA), transferrin (TRF), および immunoglobulin G (IgG) の RAECM における輸送性と輸送過程における安定性を検討した。その結果、これらの蛋白質の透過速度定数は  $10^{-9} \sim 10^{-7} \text{ cm/sec}$  となり、輸送された蛋白質の 10~95% が細胞内で代謝を受けるなど、蛋白質によりその輸送性や安定性が大きく異なることが明らかとなった。また、血漿由来の蛋白質である BSA, TRF や IgG, および OA では、代謝される割合も低いことが示された。さらに、血管側から肺胞腔側への輸送は、分子量から予測した拡散による透過量よりも高値を示すことに加え、分子量に係わらずほぼ一定値を示すことから、蛋白質は主として液性エンドサイトーシスにより輸送されるものと推察された。一方、肺胞腔側から血管側への輸送に関して、拡散による透過量の予測値より高値となることから、同様に液性エンドサイトーシスにより輸送されるものと考えられた。特に BSA, TRF, IgG および OA の輸送量が亢進しており、さらに、方向性も観察され

ることから特異的な輸送経路の存在が示唆された。

### Ⅲ. ラット肺胞培養上皮細胞層を用いたモデル蛋白質の輸送機構の解明

前章で特異的な輸送が示唆されたBSAおよび液性エンドサイトーシスのマーカーである horseradish peroxidase (HRP) を用い、蛋白質の輸送機構について詳細に検討した。HRPは濃度に比例した輸送並びに細胞内取り込み、および輸送の温度依存性を示したが、その輸送には方向性は観察されず、透過速度定数も約  $7 \times 10^{-9}$  cm/secと一定値を示した。さらに、塩化アンモニウムを用いて細胞内の代謝活性を低下させると輸送量が上昇することから、HRPは液性エンドサイトーシスにより輸送されるものと考えられた。一方、BSAを用いた輸送実験において、用いた何れの濃度においても肺胞腔から血管側への輸送が亢進しており、方向選択的なアルブミン輸送が認められた。また、本輸送経路は濃度依存性、基質特異性および温度依存性を有することから、アルブミンに特異的であることが明らかとなった。さらに、生化学的な検討によりアルブミン結合蛋白質が確認されたことから、液性エンドサイトーシスに加えて、特異的な吸着を伴うエンドサイトーシスも存在することが示された。

以上、著者はRAECMを用いて肺胞細胞レベルで蛋白質の輸送機構を検討し、拡散による透過の寄与も認められるが、多くの蛋白質は液性エンドサイトーシスによって輸送されることを示した。また、アルブミン等の血漿蛋白質に関しては、特異的な輸送経路の存在することを明らかにした。これらの蛋白質輸送系は肺胞腔表面から蛋白質を再吸収することにより、恒常性の維持に関与する可能性が示された。さらに、これらの吸収機構に関する情報は、医薬品としての蛋白質のデリバリーを研究する上で有用な基礎的知見となりうるのみならず、特異的な取り込み機構を利用した新規ドラッグデリバリーシステムの開発につながるものと考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

近年、高分子物質に対して肺が高い透過性を有することが明らかにされ、ペプチドや蛋白質の新たな吸収ルートとして注目を集めている。医薬品として有効かつ安全な臨床使用を考える上で、これら高分子薬物の経肺吸収機構を把握することは重要であると考えられる。しかし、肺組織は解剖学的に極めて複雑な構造を有するため、これまでの肺全体や単離組織を用いた検討では高分子薬物の経肺吸収機構について詳細な検討を行うことが困難であった。申請者は、Kimらにより開発されたラット肺胞のType II細胞の初代培養上皮細胞層 (Rat Alveolar Epithelial Cell Monolayer ; RAECM) に着目した。RAECMは培養過程でType I様の細胞層に分化し、肺胞上皮の構造的特徴と生理機能を再現していることから、有用なin vitro評価系であると考えられた。申請者はRAECMを用いて種々蛋白質の輸送特性について精査し、蛋白質の経肺吸収機構について以下の研究成果を得た。

まず、異なる分子量の蛍光標識デキストランを用い、RAECMの物理化学的特性ならびにRAECMにおける水溶性高分子の透過性について検討した。その結果、分子量4万以下の水溶性物質は、分子量に依存した透過速度で拡散によりRAECMを透過することが示された。また、拡散理論に基づくequivalent pore理論解析から、tight junctionは0.4nmと8nmの2種の径を有する細孔により近似されることが判明した。一方、分子量7万以上の水溶性物質は主として液性エンドサイトーシスにより輸送されることが示唆された。

次に、種々蛋白質のRAECMにおける輸送性と輸送過程における安定性について検討し、蛋白質によってその輸送性や安定性が大きく異なることを明らかにした。また、血漿由来の蛋白質であるアルブミンなどでは代謝される割合が低いこと、肺胞腔側から血管側への輸送が優位であることなどから、特異的な輸送経路が存在することが示唆された。

さらに、特異的な輸送経路の存在が示唆されたアルブミンおよび液性エンドサイトーシスのマーカーである horseradish peroxidase (HRP) を用い、蛋白質の輸送機構について詳細に検討を加えた。HRPの輸送は非特異的であり、RAECMにおいても液性エンドサイトーシスによって輸送されることが示された。一方、蛍光標識牛血清アルブミンを用いた場合、検討したいずれの濃度においても肺胞腔から血管側への方向選択的な輸送が認められた。また、本輸送経路は濃度依存性、基質特異性および温度依存性を示し、アルブミンに特異的であることを明らかにした。さらに、生化学的な検討によりアルブミン結合蛋白質の存在を確認し、特異的な吸着を伴うエンドサイトーシスの存在することが示された。

以上の研究成果は、肺胞上皮細胞における蛋白質の輸送機構について明らかにしたものであり、肺からの蛋白質吸収機構

の解明に貢献するところ大であり、薬物送達研究の発展に寄与するものと考える。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成16年2月19日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。