

氏 名	ねもと たか ゆき 根 元 貴 行
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	薬 博 第 618 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	薬 学 研 究 科 医 療 薬 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	肺細胞初代培養系を用いた活性酸素消去酵素誘導体の機能評価に関する研究
論文調査委員	(主 査) 教 授 橋 田 充 教 授 高 倉 喜 信 教 授 乾 賢 一

論 文 内 容 の 要 旨

肺は、外界と直接接する臓器であり、環境中の有害物質を吸入する危険に曝されている。近年、吸入した有害物質により産生される活性酸素が多くの肺疾患の病因となっていることが明らかとなり、スーパーオキシドジスムターゼ（SOD）やカタラーゼといった活性酸素消去酵素の吸入療法が期待を集めている。しかしながら、これら活性酸素消去酵素は、生理的条件下では負に帯電しており、細胞膜との相互作用が極めて低いため、それ自体を吸入しても有効な治療効果は得られないことが報告されている。有効かつ安全な薬物治療を行うためには、これらの動態を精密に制御できるドラッグデリバリーシステム（DDS）技術の開発が必要である。

呼吸器は解剖学的に極めて複雑な構造をした臓器であり、*in vivo* では、DDS 薬剤の機能特性を十分に評価するのが困難である。本研究では、肺局所適用型 DDS 薬剤の局所動態および治療効果を詳細に評価できる *in vitro* 実験系を確立し、これを用いて化学修飾による活性酸素消去酵素誘導体の有効性を評価した。

第 1 章 ウサギ肺胞上皮細胞初代培養系を用いた肺局所適用型 DDS 薬剤機能評価に関する基礎的検討

局所 DDS 薬剤の機能特性を *in vitro* で評価するためには、用いる細胞が *in vivo* における肺組織に類似した性質を示すことが重要である。そこで、肺胞Ⅱ型上皮細胞を単離・培養して得られた細胞層について、形態学および生理学的な検討を行い、実験評価系としての有効性を検討した。まず、得られた細胞層の電気抵抗値を測定したところ、培養4日目には2 k Ω と高い値を示したことから、細胞間にタイトなジャンクションが形成されていることを確認した。顕微鏡による形態観察では、培養細胞が扁平なⅠ型細胞様に変化していることが確認された。次に、細胞層にベンゾピレンを作用させたところ、CYP1A の基質であるエトキシレゾルフィンの酸化代謝、モノクロロビマンのグルタチオン抱合の上昇が起こり、*in vivo* でもよく知られた多環芳香族炭化水素による代謝酵素の誘導が確認された。また、Ⅱ型細胞が、肺サーファクタントの代謝にレクチンであるサーファクタントプロテインを利用することに着目し、マンノース修飾牛血清アルブミン（Man-BSA）を用いて細胞取り込みを検討したところ、ヒトサーファクタントプロテイン A の共存下 Man-BSA の細胞取り込みが上昇することが確認された。また、Man-BSA の取り込みが培養日数の経過とともに減少し、Ⅱ型細胞の性質が消失しⅠ型細胞様に分化していることが機能的に確認された。さらに、培養初期には、ヒト SP-A の共存下による Man-BSA の細胞取り込みの上昇も認められた。以上の検討より、ウサギ肺胞上皮細胞初代培養系は、*in vivo* 肺上皮組織に類似した性質を有し、肺局所適用型 DDS 薬剤に対する *in vitro* 実験評価系として妥当であることが示された。

第 2 章 活性酸素消去酵素誘導体による肺胞上皮細胞の活性酸素障害抑制

前章で確立したウサギ肺胞上皮細胞初代培養系を用いて、活性酸素消去酵素誘導体の細胞取り込みおよび細胞障害抑制効果を検討した。スーパーオキシドジスムターゼ（SOD）の動態制御を目的として、静電的相互作用による細胞膜との相互作用を期待したカチオン化 SOD（Cat-SOD）、およびサーファクタントプロテインを介した細胞取り込みを期待したマンノース修飾 SOD（Man-SOD）を合成した。肺胞上皮細胞による Cat-SOD および Man-SOD の取り込みは経時的に増加し、

2 時間後では、未修飾 SOD に比べそれぞれ156倍、8.3倍と高値を示した。また、細胞内 SOD 活性の測定および蛍光標識体を用いた顕微鏡観察により、Cat-SOD は細胞内に内在化されていることが確認された。さらに、パラコートを用いた活性酸素障害モデルを作成し、障害抑制効果を検討したところ、Cat-SOD は顕著な効果を示した。ただし、エンドサイトーシス阻害剤存在下では Cat-SOD の障害抑制効果はみられなかったことから、SOD の細胞内への移行が不可欠であることが明らかとなった。また、急性肺障害や慢性閉塞性肺疾患に対する治療薬候補として、過酸化水素を消去するカタラーゼに着目し、そのカチオン化誘導体を合成した。カチオン化カタラーゼの細胞取り込みは、Cat-SOD と同様、経時的に増大し、2 時間後では、未修飾体比に比べ30倍高い値を示した。また、培養液中へのグルコースオキシダーゼ添加により惹起した細胞の活性酸素障害に対して、カチオン化カタラーゼは顕著な障害抑制効果を示した。

第3章 肺胞マクロファージからの炎症性メディエータ産生に対するカチオン化カタラーゼの抑制効果

炎症時の肺において、肺胞マクロファージが、サイトカイン、ケモカインなどの炎症性メディエータを過剰に産生することが知られている。炎症性メディエータの産生は、NF- κ B 等の転写因子によって制御されるが、最近の研究により、細胞内で過剰に産生された過酸化水素が転写因子の制御に関与していることが明らかとなってきた。そこで本章では、カタラーゼに正電荷を付与し、カタラーゼを効率良く細胞内へ移行させることで、肺胞マクロファージからの炎症性メディエータ産生を抑制できるか検討した。リポポリサッカライド (LPS) で刺激した肺胞マクロファージに対し、カチオン化カタラーゼを投与したところ、TNF- α および CINC-1 の産生が顕著に抑制された。蛍光試薬を用いて細胞内の過酸化水素の産生を視覚的に捉えたところ、カチオン化カタラーゼで処理した場合、LPS により細胞内で産生された過酸化水素が効果的に消去されていることが示された。さらに、ゲルシフトアッセイ法により、LPS による NF- κ B の活性化を効率良く抑制していることも確認された。

以上、肺胞上皮細胞初代培養系が肺における薬物動態や DDS の機能評価に適した実験系であることを確認した上で、肺上皮における活性酸素障害に対して活性酸素消去酵素のカチオン化誘導体が有効な治療薬となり得ることを見出した。さらに、カチオン化カタラーゼは、肺胞マクロファージからの炎症性メディエータ産生を有意に抑制することも明らかにした。本研究成果は、活性酸素が関与する種々の肺疾患に対して薬物治療を行う上で有益な知見を提供するものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

外界と接する肺では、環境中の有害物質を吸入することにより産生される活性酸素が多くの疾患の病因となっていることから、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) やカタラーゼといった活性酸素消去酵素の吸入療法が期待を集めている。しかし、これら活性酸素消去酵素は組織との相互作用が小さく吸入しても有効な治療効果が得られないことから、有効かつ安全な薬物治療を行うために薬物の動態を精密に制御できるドラッグデリバリーシステム (DDS) 技術の開発が求められている。本研究では、解剖学的に極めて複雑な構造をした呼吸器においては *in vivo* での DDS 製剤の機能特性評価が困難であることから、まず肺局所適用型 DDS 製剤の局所動態および治療効果を詳細に評価できる *in vitro* 実験系を確立し、これを用いて化学修飾を利用した活性酸素消去酵素誘導体型 DDS の有効性を評価した。

最初に肺における局所作用発現を期待する DDS 製剤の *in vitro* 評価を目的として、ウサギ肺胞 II 型上皮細胞を単離、培養して細胞層を得、タイトなジャンクション形成、扁平な I 型細胞様形態への変化、代謝誘導、形態学および生理学的な検討により、実験評価系としての有効性を確認した。次に、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) の動態制御を目的として、静電的相互作用による細胞膜との相互作用が期待できるカチオン化 SOD (Cat-SOD) とサーファクタントプロテインを介した細胞取り込みを期待するマンノース修飾 SOD (Man-SOD) を合成し、確立したウサギ肺胞上皮初代培養系を用いて細胞取り込みおよび細胞障害抑制効果を検討した。肺胞上皮細胞による Cat-SOD および Man-SOD の取り込みは未修飾 SOD に比べそれぞれ156倍、8.3倍と高値を示し、細胞内 SOD 活性の測定および蛍光標識体を用いた顕微鏡観察により Cat-SOD は細胞内に内在化されていることが確認された。さらに、パラコートを用いた活性酸素障害モデルを用いて障害抑制効果を検討した結果、Cat-SOD が顕著な効果を示した。一方、過酸化水素を消去するカタラーゼのカチオン化誘導体を合成し評価した結果、細胞取り込みは未修飾体比に比べ30倍となり、また培養液中へのグルコースオキシダーゼ添加により惹起した細胞の活性酸素障害に対して顕著な障害抑制効果を示した。さらに、炎症時の肺において肺胞マクロファ

ジがサイトカイン，ケモカインなどの炎症性メディエータを産生し，これに細胞内で過剰に産生された過酸化水素が NF- κ B 等の転写因子の活性化を通じて関与していることから，カチオン化カタラーゼの炎症性メディエータ産生抑制効果を検討した結果，リポポリサッカライドで刺激した肺胞マクロファージに対し，カチオン化カタラーゼは TNF- α および CINC-1 の産生を顕著に抑制した。また，この際カチオン化カタラーゼが細胞内の過酸化水素の産生と NF- κ B の活性化を効率良く抑制していることが確認された。

以上，肺胞上皮細胞初代培養系が肺における薬物動態や DDS の機能評価に適した実験系であることを確認し，これを用いて肺上皮における活性酸素障害に対して活性酸素消去酵素のカチオン化誘導体が有効な治療薬となり得ることを見出した。さらに，カチオン化カタラーゼは，肺胞マクロファージからの炎症性メディエータ産生を有意に抑制することも明らかにした。以上，本研究成果は活性酸素が関与する種々の肺疾患に対する薬物治療の開発に有益な知見を提供するものと考えられる。

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19年2月23日論文内容とそれと関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。