

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08191

研究課題名(和文) アミオダロン間質性肺炎における肺胞 II 型上皮細胞での肺サーファクタント代謝の解明

研究課題名(英文) Analysis of lung surfactant metabolism of alveolar type II cells in amiodarone-induced interstitial pneumonia

研究代表者

長内 和弘 (OSANAI, Kazuhiro)

金沢医科大学・総合医学研究所・教授

研究者番号：70221158

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：アミオダロン実験肺障害モデルにおいて、形態的に II 型細胞、層状封入体の大型化がみられ、単離 II 型細胞におけるホスファチジルコリンの合成能が亢進し、肺組織中のホスファチジルコリンの de novo 合成酵素、リモデリング合成酵素とも mRNA 発現が亢進し、肺組織中サーファクタントプロテイン mRNA 発現量に差はなかったが、SP-A と SP-D タンパク量は増加がみられた。以上の結果よりアミオダロン肺障害における肺組織中リン脂質過剰蓄積には従来知られていたリソソーマルホスホオリパーゼ A2 の抑制によるリン脂質分解低下のみならず、II 型細胞におけるリン脂質合成亢進が関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アミオダロンは重大な難治性不整脈に対して優れた効果があり、現在も臨床現場で広く用いられているがときに致死性の間質性肺炎を引き起こす危険な薬剤である。本研究は肺の特異的物質である肺サーファクタント代謝に注目し同肺障害の本態である肺組織中リン脂質過剰蓄積には従来知られていたリソソーマルホスホオリパーゼ A2 の抑制によるリン脂質分解低下のみならず、II 型細胞におけるリン脂質合成亢進が関与していることが示唆された。この結果はアミオダロンによって発症する間質性肺炎についての新たな機序を明らかにしたものであり、同間質性肺炎の予防についての知見が深まり、新たな診断・治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：We have investigated amiodarone-induced experimental lung disease in rats and found the following new findings. Alveolar type II cells are enlarged and contain larger lamellar bodies in the cytoplasm. Isolated alveolar type II cells show enhanced synthesis of phosphatidylcholine in vitro. Messenger RNA levels of the de novo synthesis enzyme and the remodeling enzyme of phosphatidylcholine are higher in the lung tissues. There is no significant difference of mRNA expression levels of surfactant protein (SP)-A, -B, -C, and -D in the lung tissue, protein levels of SP-A and SP-D were increased. These results suggest that enhanced phospholipid synthesis in the alveolar type II cells play a significant role in the phospho-lipidosis of the amiodarone-affected lungs as well as previously discovered inhibition of lysosomal phospholipase A2 and consequent inhibition of phospholipid catabolism.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：アミオダロン 肺障害 ラット 肺サーファクタント 肺胞 II 型上皮細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アミオダロンは第 Ⅲ 群抗不整脈薬に分類され、ヨードを含む分子量 681.7 のベンゾフラン誘導体であり、リン脂質過剰症を生じる薬物に多くみられる親水性・親油性の両親媒性を示す。心室細動や心室粗動、心房細動などの難治性の頻脈性不整脈に対し他剤では代用できない極めて有用な薬剤であるが、ときに致死性の重篤な肺障害(間質性肺炎)を併発する(1)。診断は臨床経過と画像所見、血中アミオダロン濃度測定値を総合して行われるが、画像所見は基礎にある心不全による陰影との判別が困難なことがあり、発症と血中濃度の閾値は明確でなく診断はしばしば困難である。

アミオダロン間質性肺炎の病理組織学的特徴は、肺胸腔での泡沫細胞の出現や組織中での過剰リン脂質蓄積である(2)。泡沫細胞の本態は、脂質成分が細胞内へ過剰貯留した肺胞マクロファージであり、アミオダロン間質性肺炎にみられる特徴的所見である。リン脂質過剰蓄積の原因として、アミオダロンによるマクロファージ内リソゾームホスホオリパーゼ A₂ 活性(LPLA2)の抑制とそのためのリン脂質分解の抑制が報告された(3)。肺はサーファクタントリン脂質を大量に合成・分泌する臓器である。ホスファチジルコリンをはじめとするリン脂質は細胞生体膜の主要構成成分であるとともに肺サーファクタントの主要構成成分でもある。肺サーファクタントは肺に特異的な生体物質であり、約 90% はホスファチジルコリンを主成分とするリン脂質であり、残り約 10% は 4 種類のサーファクタントアポタンパク質から構成される(4)。しかし、アミオダロン肺障害において肺の特異的物質である肺サーファクタントの代謝への影響に注目した研究は数少ない。

2. 研究の目的

本研究では、ラットを用い経口投与によるヒトに近いアミオダロン間質性肺炎モデルを作製し、肺サーファクタント合成酵素、サーファクタントプロテイン A、B、C、D のタンパク量・遺伝子発現レベルの変化、Ⅱ型細胞でのリン脂質合成能、Ⅱ型細胞・層状封入体の形態変化、肺組織レベルでの各リン脂質分画の変化を明らかにし、アミオダロンが肺サーファクタント合成系におよぼす影響を解明する。

3. 研究の方法

(1) 実験アミオダロン肺障害ラットの作製

Fischer 344 系ラット(8~9 週齢オス)に塩酸アミオダロン(100 mg/kg 体重)を胃ゾンデを用いて手動的に毎日 1 回、4 週間、強制経口投与した。

(2) 気管支肺胞洗浄(Bronchoalveolar lavage, BAL)液の解析

BAL 液の回収

左肺を生理食塩水 2.5 ml で洗浄、回収し、5 回繰り返しプールした。細胞成分をメイ・ギムザ染色で染色し、光学顕微鏡にて細胞分画を算出するとともに、面積計測ソフト(Area Manager Professional Lite, ビジヨナリー社)にて細胞面積を測定した。またグルタルアルデヒド固定後、四酸化オスミウムにて後固定し、透過型電子顕微鏡で鏡顕した。

サーファクタントアポタンパク質の定量解析

一次抗体としてはマウス抗ラット surfactant protein (SP)-A 抗体(1D6, National Jewish Health)やウサギ抗ヒツジ SP-B 抗体(Chemicon 社)、ウサギ抗マウス SP-D 抗体(Chemicon 社)を用い、Western blot を施行し、イメージアナライザー(Image Quant LAS 4000 mini)で測定した。

(3) Ⅱ型細胞の解析

Ⅱ型細胞の単離と培養

気管よりブタ膀胱エラスターゼを注入して消化処置、イオパミドール密度勾配法を用いて低速遠心を行った。単離Ⅱ型細胞の一部はアガロースゲル中に包埋し、(2)と同様な方法で処理し、電顕にて検鏡した。

サーファクタントアポタンパク質、リン脂質合成酵素の mRNA 発現解析

単離Ⅱ型細胞からトータル RNA を抽出した。SuperScript III assay kit(Invitrogen 社)を用いて cDNA を作成し、Taqman 法を用いてリアルタイム PCR 法による mRNA レベル発現解析を行った。各々のプローブとプライマーは Applied Biosystem 社から購入した。

単離Ⅱ型細胞のホスファチジルコリン合成能の計測

単離Ⅱ型細胞の培養液中に [³H] 塩化コリンを加え培養した後、細胞成分より脂質成分を Bligh-Dyer 法にて抽出し、[³H] 活性を液体シンチレーションを用いて測定し、単位蛋白量当たりの [³H] ホスファチジルコリンの合成能を算出した。

(4) 肺組織の解析

肺組織の採取

左肺を摘出し RNAlater 処理後に急速凍結・保存した。右肺の中・下葉を切離し急速凍結・保存した。残った右上葉を 10% 中性緩衝ホルマリンによる 25 cmH₂O 定圧固定処理を行った。

リン脂質の定量

各サンプルの凍結保存した肺組織をホモジナイズし、Bligh-Dyer 法にて脂質成分を抽出した後、Bartlett 法によって総リン脂質量を測定した。一定量の脂質サンプルを、ホウ酸添加シリカゲル G プレートに添加し、二次元薄層クロマトグラフィーを行い、各リン脂質成分を掻きとり、Bartlett 法にて同様に定量した。

(5) 統計解析

データは平均値 ± 標準偏差で表し、平均値の非対応 Student t test による解析で P<0.05 を有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) 気管支肺胞洗浄(BAL)液中の細胞成分、サーファクタント蛋白量

BAL 液中の細胞分画と形態変化

BAL 液の平均回収量は約 11 ml で、群間による差はなかった。コントロール群では、正常ラットと同様、95%以上が肺胞マクロファージであった。コントロール群 vs アミオダロン投与群で総細胞数とマクロファージ数はそれぞれ、 $1.9 \pm 0.3 \times 10^5/\text{ml}$ vs $4.9 \pm 1.2 \times 10^5/\text{ml}$ ($p<0.01$)、 $1.7 \pm 0.2 \times 10^5/\text{ml}$ vs $4.0 \pm 1.4 \times 10^5/\text{ml}$ ($p<0.01$)と総細胞数は 3.8 倍、マクロファージ数は 2.9 倍に有意に増加した。好中球は対照群ではほとんど認められなかったが、アミオダロン投与群では $0.7 \pm 0.3 \times 10^5/\text{ml}$ 出現した。リンパ球や好酸球の有意な増加はみられなかった。

アミオダロン投与群の肺胞マクロファージは細胞質が泡沫状を呈し、細胞面積がアミオダロン投与群 vs コントロール群では $770.1 \pm 280.5 \mu\text{m}^2$ vs $373.1 \pm 89.5 \mu\text{m}^2$ ($p<0.05$)と約 2.1 倍に増加した。アミオダロン投与群のマクロファージでは細胞質内の貪食空胞が著明に拡大し増加している像が観察された。これらの細胞変化は泡沫状マクロファージと呼ばれる像に一致する。

サーファクタント蛋白量の変化

Western blot 法による解析によりコントロール群のサーファクタント蛋白分画発現量の平均値を 1 とすると SP-B はアミオダロン投与群と差はみられなかったが、SP-A は 2.4 ± 0.5 ($p<0.05$)、SP-D は 2.5 ± 0.5 ($p<0.05$)といずれも有意に増加していた。

(2) 単離 II 型細胞の超微形態像とホスファチジルコリン合成能

超微形態

単離 II 型細胞について電子顕微鏡を用いた観察により、アミオダロン投与群では細胞面積ならびに層状封入体に一致する空胞構造面積の増大を認めた。上記で述べた定量的形態計測ソフトを用いた結果、対照群と比較しアミオダロン投与群では、細胞質面積、空胞構造面積はそれぞれ、 $53.2 \pm 10.3 \mu\text{m}^2$ vs $77.4 \pm 19.3 \mu\text{m}^2$; $0.60 \pm 0.47 \mu\text{m}^2$ vs $1.11 \pm 0.85 \mu\text{m}^2$ と有意な増大が確認された($p<0.01$)

ホスファチジルコリン合成能

単離 II 型細胞におけるホスファチジルコリン合成能は、コントロール群 vs アミオダロン投与群では $23.6 \pm 7.8 \times 10^6 \text{ dpm}/\text{mg protein}$ vs $39.8 \pm 7.0 \times 10^6 \text{ dpm}/\text{mg protein}$ と、 $[^3\text{H}]$ 塩化コリンの $[^3\text{H}]$ ホスファチジルコリンへの取り込みは有意に増加し ($p<0.01$)、アミオダロン投与群の II 型細胞ではリン脂質合成が亢進していることが示された。

(3) 肺組織における病理所見やサーファクタント蛋白やリン脂質合成酵素群の mRNA 遺伝子発現、リン脂質量

肺組織の病理所見

アミオダロン投与群はコントロール群に比し、単核細胞の軽度集積と軽度な充血による肺胞中隔の肥厚が認められた。肺胞マクロファージは細胞質の泡沫化と大型化がみられ、局在部位より II 型細胞と考えられる コーナー細胞は細胞質の空胞化を伴う大型化がみられた。

サーファクタント蛋白やリン脂質合成酵素群の mRNA 発現

コントロール群と比較しアミオダロン投与群では、リン脂質 *de novo* 経路合成酵素である PCYT1A 遺伝子とリモデリング経路合成酵素の LPCAT1 遺伝子が、それぞれ 1.5 倍、2.3 倍に有意に増加していた。これに反し、サーファクタント蛋白 SP-A、-B、-C、-D の mRNA 遺伝子発現には有意な差異は認められなかった。

リン脂質の定量

コントロール群 vs アミオダロン投与群では、総リン脂質 $27.5 \pm 2.3 \text{ mg}/\text{g tissue}$ vs $50.0 \pm 12.7 \text{ mg}/\text{g tissue}$ 、ホスファチジルコリン $17.5 \pm 2.6 \text{ mg}/\text{g tissue}$ vs $33.8 \pm 6.4 \text{ mg}/\text{g tissue}$ 、リゾホスファチジルコリン $0.64 \pm 0.09 \text{ mg}/\text{g tissue}$ vs $1.87 \pm 0.81 \text{ mg}/\text{g tissue}$ 、ホスファチジルグリセロール $1.45 \pm 0.75 \text{ mg}/\text{g tissue}$ vs $4.42 \pm 3.15 \text{ mg}/\text{g tissue}$ とアミオダロン投与群でいずれも有意な増加を認めた ($p<0.05$)。

アミオダロン間質性肺炎の本態はリン脂質過剰蓄積であることが判明し、リソゾーマルホスフォオリパーゼ A₂ 活性が抑制されていること、同酵素は肺胞マクロファージに特異的に高発現しているところから、肺でのリン脂質過剰蓄積は肺胞マクロファージによるリン脂質分解活性の低下と考えられるようになった(3)。その機序は、両新媒性イオンであるアミオダロンが形質膜のリン脂質層に入り込み陽性荷電 LPLA₂ と陰性荷電リン脂質との電氣的相互作用を阻害することで酵素作用を抑制すると説明されている(5)。すなわち、肺胞マクロファージによるリン脂質分解・クリアランス機構の破綻がリン脂質過剰蓄積の原因と考えられている。しかし肺はリン脂質が主成分である肺サーファクタントを大量に合成、分泌する特徴がある。肺胞腔へ分泌された肺サーファクタント成分は、再度 II 型細胞へ取り込まれ再利用が行われるか肺胞マクロファージによって貪食処理されるかの経路をとることが知られている(6)。

実験動物を用いたアミオダロン肺障害モデルには経気管投与モデルが用いられてきたが臨床での投与方法と異なるため結果には注意が必要である(6, 7)。本研究ではより臨床に近い経口反復投与で行った。アミオダロン肺障害患者の肺組織ではリン脂質量の増加や泡沫状マクロファージの出現が特徴的とされてきた(2)。今回のラットを用いた実験でも総リン脂質量の増加がみられ、肺胞マクロファージの数の増加、断面積の増大、貪食小胞の著明な増加・増大などは従来言われてきた泡沫マクロファージに一致する所見であり、適切なアミオダロン実験肺障害モデルが得られたと判断される。

今回の実験では新たに II 型細胞の変化が観察された。すなわち、II 型細胞は断面積、層状封入体に相当する小胞断面積とも増加し、大型化が観察された。さらに単離 II 型細胞におけるリン脂質合成活性の増加、肺組織における *de novo* ホスファチジルコリン合成酵素及びリモデリング経路酵素に関わる遺伝子の発現増加、および肺組織中の総リン脂質量、ホスファチジルコリン量、リソホスファチジルコリン量、ホスファチジルグリセロール量などのリン脂質成分の増加がみられた。これらの結果よりアミオダロン肺障害における II 型細胞における肺サーファクタント脂質成分の合成亢進が明らかとなった。

今回の検討により、肺組織内へのリン脂質の増加のほか、肺サーファクタントリン脂質の主成分であるホスファチジルコリンの *de novo* 合成系及びリモデリング合成系両経路の遺伝子発現の亢進が明らかとなった。さらに、単離 II 型細胞での [³H]ホスファチジルコリン合成能が亢進しており、超微形態観察と計測でも同細胞内の層状封入体の数の増加・サイズの増大が示された。肺組織中におけるリン脂質分画の解析により、肺サーファクタントの特異的成分であるホスファチジルグリセロールが有意に増加していたところから、亢進しているホスファチジルコリンの合成が生体膜構成成分としてだけでなく肺サーファクタント成分としても起きていることを示唆する結果である。

今回、新たにアミオダロン肺障害における 4 種類の肺サーファクタントプロテイン量の変化も解明された。SP-A、SP-B、SP-C、SP-D の遺伝子発現量は有意な差異を示さなかったが、気管支肺胞洗浄液中では SP-B タンパク量には変化は認めなかったが、SP-A および SP-D のタンパク量は 2 倍以上に増加していた。SP-B はリン脂質との結合親和性が高く、合成後にリン脂質とともに層状封入体に貯蔵され、分泌刺激を受けてエキソサイトーシスされ、肺胞表面へのリン脂質の吸着に重要であり表面活性に不可欠な役割を演じる(8)。一方、SP-A、SP-D は合成された後、層状封入体へは貯蔵されず、恒常的に細胞外へ分泌され、表面張力低下作用にはほとんど関与せず、肺における自然免疫に重要な役割を演じる(4)。

今回の研究によって、アミオダロン肺障害でみられる肺組織へのリン脂質過剰蓄積は、従来知られていた肺胞マクロファージにおけるリン脂質の分解活性抑制に加え、II 型細胞での肺サーファクタントリン脂質成分の合成経路の活性亢進が関与している可能性が示された。

文献

- (1) Spyros A, et al. Amiodarone - Review of Pulmonary Effects and Toxicity. Drug Saf 33:539-58, 2010.
- (2) Adams PC, et al. Amiodarone and its desethyl metabolite: tissue distribution and morphologic changes during long-term therapy. Circulation 72: 1064-75, 1985.
- (3) Ernawati DK, et al. Amiodarone induced pulmonary toxicity. Br J Clin Pharmacol 66: 82-7, 2008.
- (4) Osanai K, et al. Pulmonary surfactant transport in alveolar type II cells. Respirology 11: S70-3, 2006.
- (5) Shayman JA, et al. Drug induced phospholipidosis: An acquired lysosomal storage disorder. Biochim Biophys Acta 1831: 602-11, 2013.
- (6) Taylor MD, Van Dyke K, Bowman LL, Miles PR, Hubbs AF, Mason RJ, Shannon K, Reasor MJ. A characterization of amiodarone-induced pulmonary toxicity in F344 rats and identification of surfactant protein-D as a potential biomarker for the development of the toxicity. Toxicol Appl Pharmacol. 167:182-90, 2000.
- (7) Mahavadi P, Henneke I, Ruppert C, Knudsen L, Venkatesan S, Liebisch G, et al. Altered surfactant homeostasis and alveolar epithelial cell stress in amiodarone-induced lung fibrosis. Toxicol Sci 142:285-297, 2014.

(8) Whitsett JA, et al. Hydrophobic Surfactant Proteins in Lung Function and Disease.
N Engl J Med 347:2141-48, 2002.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Osanai Kazuhiro, Mizuno Shiro, Toga Hirohisa, Takahashi Keiji	4. 巻 -
2. 論文標題 Trafficking of newly synthesized surfactant protein B to the lamellar body in alveolar type II cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00441-020-03232-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kazuhiro Osanai	4. 巻 43
2. 論文標題 Aberrant lung surfactant homeostasis in Rab38-deficient animal models of Hermansky-Pudlak syndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Kanazawa Med Univ	6. 最初と最後の頁 51～59
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Osanai Kazuhiro	4. 巻 19
2. 論文標題 Rab38 Mutation and the Lung Phenotype	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2203～2203
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms19082203	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 長内和弘	4. 巻 49
2. 論文標題 Rab38低分子量Gタンパク質の遺伝子変異と肺病変	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本肺サーファクタント・界面医学会雑誌	6. 最初と最後の頁 13-24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長内和弘
2. 発表標題 肺胞II型上皮細胞における新合成肺サーファクタントプロテインBの輸送経路
3. 学会等名 日本肺サーファクタント・界面医学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	及川 理恵子 (OIKAWA Rieko) (40410336)	金沢医科大学・医学部・助教 (33303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------