

平成23年5月23日現在

機関番号：34517

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790051

研究課題名（和文） マクロファージにおける薬剤誘発性ホスホリピドーシス発症メカニズムの解明

研究課題名（英文） Mechanism of drug-induced phospholipidosis in macrophages

研究代表者

黒田 幸弘（KURODA YUKIHIRO）

武庫川女子大学・薬学部・准教授

研究者番号：60314225

研究成果の概要（和文）：

薬剤誘発性ホスホリピドーシス（DIPL）の発症機作は不明であり、今日いくつかの仮説が提唱されている。本研究課題では、細胞によるリン脂質の取り込み能の亢進、および、細胞内酸性オルガネラの中和、がその原因であるかどうかを検討した。細胞内リン脂質量は細胞の各種リン脂質取り込み経路の阻害剤を添加しても変化はなく、細胞のリン脂質取り込みが DIPL の原因ではないと考えられた。また、薬物による酸性オルガネラの中和能については、人工リポソームにおいては DIPL 誘発能の有無によって違いはなかった。

研究成果の概要（英文）：

The mechanism of drug-induced phospholipidosis is unclear. Among hypotheses proposed, two were examined in the present study: i) excessive cellular uptake of phospholipids and ii) neutralization of acidic vesicles by drug accumulation. Phospholipid content in the cells increased by treatment of phospholipidosis-inducing drugs as measured by DiI phospholipid probe. Increased cellular phospholipid accumulation did not decrease following treatment with inhibitors of taking-up pathways. Regardless of their phospholipidosis-inducing potential, drugs characterized by a high pKa value effectively accumulated in liposomes. This accumulation caused an upward shift of the interior pH of liposomes, which was independent of phospholipidosis-inducing potential of drugs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生体分析学，薬品分析学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：ホスホリピドーシス，マクロファージ，リポソーム，塩基性薬物，両親媒性薬物

1. 研究開始当初の背景

薬剤誘発性ホスホリピドーシス（DIPL）の発症メカニズムは不明であるが、リン脂質合成の亢進、リン脂質取り込み量の増加、リン脂質分解酵素の阻害、リン脂質輸送系の阻害（酸性オルガネラの中和）、が提唱されて

いる（*Pharmacol. Rev.*, 42, 327-354, 1990）。これらのうち、リン脂質分解阻害や塩基性両親媒性薬物（CAD）の代謝阻害は多くの研究により DIPL 発症とよく相関することが示されており、DIPL の主要な発症因子として考える説が現在支持されている。一方、リン脂質

取り込みに関しては、CAD がリン脂質の取込み機構にどのように関係するのか全く未知である。既存の *in vitro* のスクリーニング方法（物理化学的評価法、細胞培養評価法）はリン脂質分解阻害や CAD の代謝阻害を直接的に観測する方法ではないため、予測精度に限界がある。研究代表者らはこの改善を目的とした *in vitro* ホスホリピドシス誘発能予測法研究を実施し、物理化学的パラメータに加えこれらの因子に関わる生化学的パラメータを追加した方法が高い予測精度を与えることを見出している (*Toxicol. In Vitro*, 24, 661-668, 2010)。しかし、予測精度のさらなる向上を目指すには発症機作の解明が必要である。そこで申請者はマクロファージ系セルラインをモデル細胞として、CAD 負荷状態における細胞内リン脂質蓄積とリン脂質の取り込み、および酸性ベシクルへの CAD の集積を解析し、DIPL の発症機作に迫った。

2. 研究の目的

(1) 過剰に蓄積されたリン脂質が、細胞におけるリン脂質の代表的な取り込み経路を阻害することによって変化するかどうかを検討した。

(2) 塩基性物質は内水相が酸性の脂質リン脂質ベシクルに自発的に集積する性質をもつ。細胞内の酸性オルガネラが CAD の集積によって中和されることによって、ホスホリピドシスが発症するかどうかを推測するために、薬物の人工ベシクルへの集積度がホスホリピドシス誘発能と関係があるかどうか検討した。

(3) 細胞内リン脂質蓄積量が細胞内薬物濃度とどのような関係にあるのか検討した。

3. 研究の方法

(1) DIPL 陽性の CAD (アミオダロン、クロルプロマジン、イミプラミン、プロプラノロール、クロロキン) を RAW264 細胞に投与し、過剰に蓄積されたリン脂質が、リン脂質の代表的取り込み経路 (LDL 受容体、SR-A 受容体、CD36、ピノサイトーシス) の阻害剤 (抗 LDL 受容体抗体、ポリイノシン酸、sulfo- N-succinimidyl oleate (SSO)、サイトカラシン D) の阻害剤によって変化するかどうかを検討した。リン脂質量は、脂質標識プローブの取り込み量をフローサイトメトリーにより測定することにより見積もった。

(2) 内水相が酸性 (pH4.0)、外水相が中性 (pH7.0) のリポソームへの CAD 集積効率

が、CAD のホスホリピドシス誘発能の有無で異なるかどうかを LC-MS/MS を用いて調べた。また、ベシクルの pH 変化を pH 依存性蛍光プローブを用いて人工ベシクルで観測した。

(3) CAD を投与した細胞のリン脂質量を直接定量し、別途測定した細胞内薬物量との関係を調べた。リン脂質量は細胞中脂質成分を Folch 法により抽出し、抽出物中のリン原子の物質量をリンモリブデンブルー法により測定した。並行して細胞中タンパク質量を Lowry 法により測定し、タンパク量当たりのリン脂質量を求めた。

4. 研究成果

(1) RAW264 細胞内のリン脂質量をモニターするためにリン脂質標識蛍光プローブである DiI の取り込み量を測定する評価系を立ち上げた。陽性コントロールであるバフィロマイシンおよび DIPL 陽性薬物群では強い DiI 蛍光が得られ、DIPL 陰性薬物群では蛍光は認められなかった (図1)。この評価法を用いてリン脂質取り込み亢進仮説の検討を実施した。DIPL 陽性の CAD を RAW264 細胞に投与し、過剰に蓄積されたリン脂質が、リン脂質の代表的取り込み経路 (LDL 受容体、SR-A 受容体、CD36、ピノサイトーシス) の阻害剤によって変化することはなかった (図2)。このことからリン脂質取り込みの亢進が DIPL の主たる発症原因でないことが推測された。

(2) 内水相が酸性のリポソームへの CAD の集積効率はホスホリピドシス誘発能の有無にかかわらずほぼ同等であった (図3)。また集積によって人工ベシクルの pH は上昇 (表1及び図4) した。このことから薬物が塩基性であること自体はホスホリピドシス誘発能の原因にはならない可能性が示唆された。しかし、細胞レベルでも同じことが言えるかどうかを確認する余地が残っている。

(3) CAD を投与した細胞のリン脂質量を直接定量し、別途測定した細胞内薬物量との関係を調べた。薬物 (クロルプロマジン、イミプラミン、5~50 uM) の暴露時間の増加に伴いリン脂質蓄積量が増し、48時間の暴露でおよそ2倍程度まで増加した。暴露を中止するとその後のリン脂質量は減少し、48時間後には元のレベルにまで減少した。現在、細胞中薬物濃度との関係を調査中である。

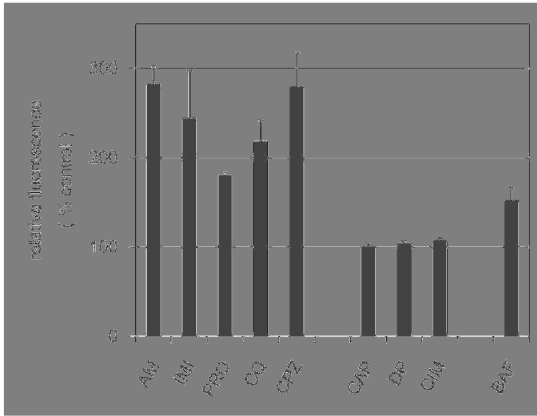


図1 フローサイトメトリー法にて測定された、CAD投与前後におけるRAW264細胞中脂質標識プローブ (DiI) の蛍光強度比

DIPL陽性薬物；AM：アミオダロン，IMI：イミプラミン，PRO：プロプラノロール，CQ：クロロキン，CPZ：クロルプロマジン，DIPL陰性薬物；CAP：クロラムフェニコール，DP：ジソピラミド，CIM：シメチジン，陽性コントロール；BAF：パフィロマイシンA1。チューキー検定において，DIPL陽性化合物群とDIPL陰性化合物群の間で有為差が認められた ($p>0.05$, $n=4$)。

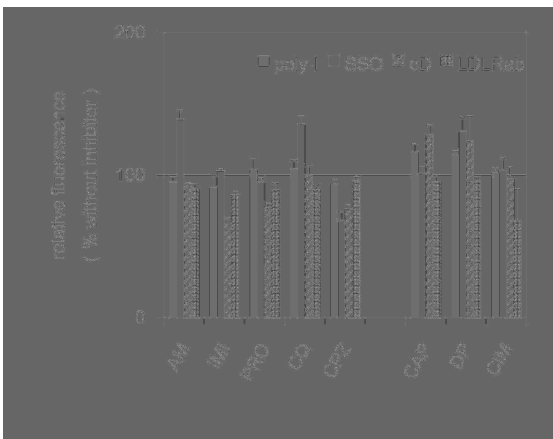


図2 脂質取り込み経路の阻害剤の投与有無におけるRAW264細胞内脂質量比

脂質標識プローブ (DiI) の蛍光強度をフローサイトメトリー法で測定した。ウィルコクソン検定において，いずれも100%と有為差は認められなかった ($p>0.05$, $n=3$)。Poly-I：ポリイノシン酸，SSO：スルホ-N-スクシンイミジルオレエート，cD：サイトカラシンD，LDLRab：抗LDL受容体抗体。薬物の略号は図1に同じ。

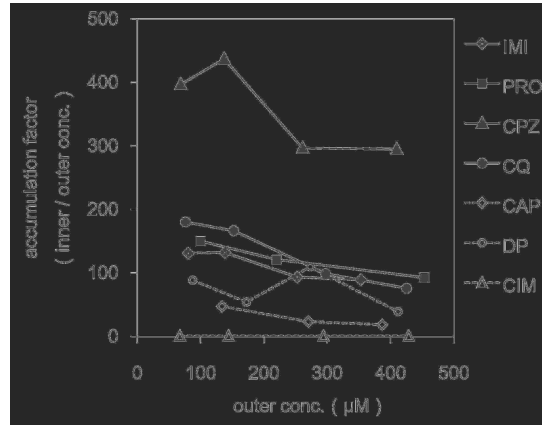


図3 DIPL陽性薬物と陰性薬物における，内水相酸性リポソームへの自発的集積能の比較

直径100 nmの卵黄リン脂質リポソームを酸性緩衝液 (pH4.0) 中で調製後，リポソーム外水相を中性緩衝液 (pH7.0) に対して透析した。その後，リポソームを透析膜内に保ちつつ薬物をリポソーム外水相に添加し，自発的にリポソーム内に集積させた。一晚経過後，透析膜内外両液に含まれる薬物濃度をHPLC-MS/MSで定量した。リン脂質分子の占める面積を 0.65 nm^2 と仮定してリポソーム内水相の体積を求め，リポソーム内外における薬物濃度比を算出した。薬物の略号は図1に同じ。CAPのみ中性薬物。CIMは塩基性薬物であるが pK_a が7.0と，他の薬物 ($pK_a>8.7$) に比べて著しく小さい。

表 1 DIPL 陽性薬物と陰性薬物における内水相酸性リポソームの中和能の比較

薬物	DIPL	内水相の pH		
		薬物添加時	1時間後	18時間後
イミプラミン	陽性	5.0	6.3	6.2
ジソピラミド	陰性	5.0	6.5	6.2

Lysosensor Green DND-189 ($0.5 \mu\text{M}$) を内封した卵黄リン脂質リポソームの外水相に薬物を添加した。その後，蛍光分光光度計にて蛍光強度 (ex. 443nm, em. 505nm) を測定し，別途求められた検量線 (図4の上図) をもとに pH を決定した。

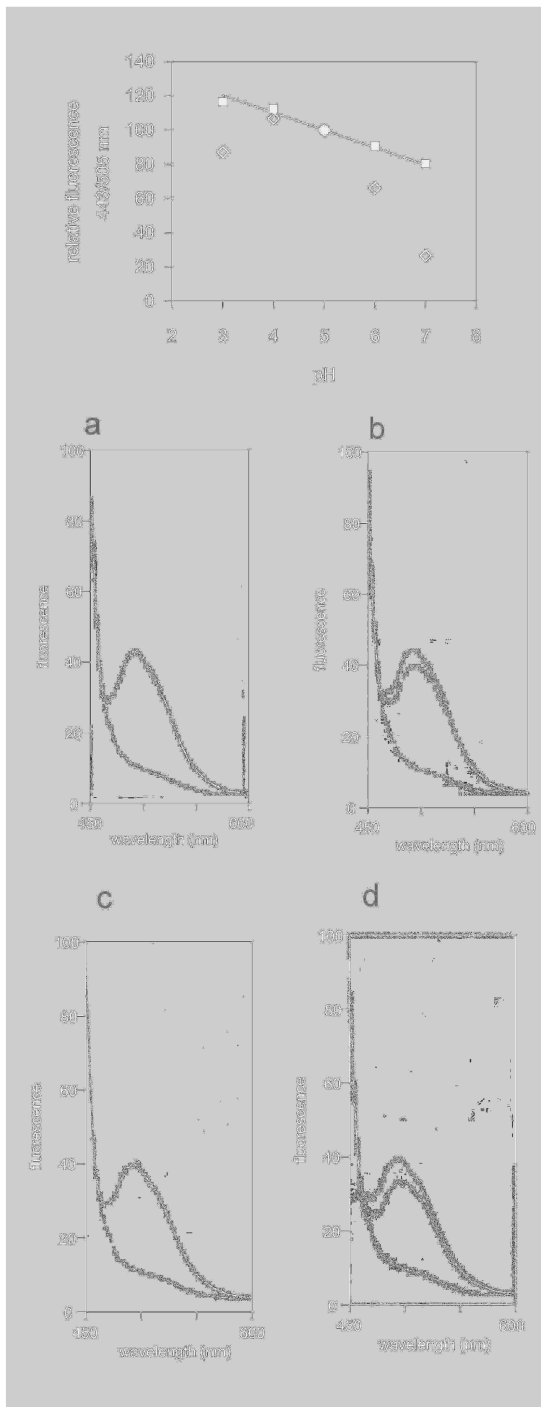


図4 DIPL陽性薬物と陰性薬物における、内水相酸性リポソームへの自発的集積能の比較

内水相に含まれるpH依存性蛍光色素（Lysosensor Green DND-189）の発する蛍光強度（ex. 443nm, em. 505nm）から内水相のpHを評価した。

上図：リポソームの有無におけるLysosensor Green DND-189の蛍光強度のpH依存性。白色菱形および黒色四角はそれぞれリポソームなしおよびリポソームありを示す。

下図：DIPL陽性薬物と陰性薬物の添加における、リポソーム内封Lysosensor Green DND-189

の蛍光スペクトル。a：イミプラミン（DIPL陽性薬物）添加直後，b：イミプラミン添加1時間後，c：ジソピラミド（DIPL陰性薬物）添加直後，d：ジソピラミド添加1時間後。実線と一点鎖線はそれぞれ薬物の添加ありと添加なしを示し，破線はリポソームのみのスペクトルを示す。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計0件）

〔学会発表〕（計4件）

1. 黒田幸弘，DIPL陽性薬物の持続暴露に伴う細胞内リン脂質蓄積量の継時変化，日本薬学会第131年会，平成23年3月30日，ツインメッセ静岡

2. 黒田幸弘，細胞のリン脂質取り込み能や酸性オルガネラ内pH中和能から薬剤誘発性ホスホリピドーシスを予測できるか，第23回バイオメディカル分析科学シンポジウム，平成22年7月23日，ホテル松島大観荘

3. 黒田幸弘，薬物のリン脂質症誘発能と細胞の脂質取り込みおよび酸性ベクシル内薬物集積量との関係，第37回日本トキシコロジー学会学術年会，平成22年6月17日，沖縄コンベンションセンター

4. 黒田幸弘，カチオン性両親媒性薬物による細胞内リン脂質蓄積効果とリン脂質取り込み経路および細胞内pH勾配の関係，日本薬学会第130年会，平成22年3月30日，岡山大学

6. 研究組織

(1)研究代表者

黒田 幸弘 (KURODA YUKIHIRO)

武庫川女子大学・薬学部・准教授

研究者番号：60314225

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし