

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (B)  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19390043  
 研究課題名 (和文) 経肺投与 DDS の基盤確立に向けた肺胞 I 型/II 型上皮細胞のタンパク質輸送機構解明  
 研究課題名 (英文) Study on the transport of proteins in alveolar type I /II epithelial cells for the development of new pulmonary DDS systems  
 研究代表者  
 高野 幹久 (TAKANO MIKIHISA)  
 広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
 研究者番号：20211336

研究成果の概要 (和文)：初代培養ラット肺胞上皮 II 型・I 型細胞を用いて、アルブミンの輸送について比較解析したところ、取り込みは II 型のほうが I 型に比べて高く、またクラスリン介在性エンドサイトーシスによることが明らかとなった。一方、インスリンの取り込みは両細胞で同程度であり、クラスリンの関与は小さかった。ラット肺胞上皮 II 型由来の RLE-6TN 細胞においてもインスリンはエンドサイトーシスによって取り込まれ、その取り込みはカチオン性ポリアミノ酸によって促進された。カチオン性ポリアミノ酸の効果は、ラットを用いた *in vivo* インスリン経肺投与実験でも認められた。これらの知見は新たな経肺投与製剤の開発のための情報として重要である。

研究成果の概要 (英文)：The uptake of albumin by primary cultured alveolar type II cells was higher than that by type I cells, and was clathrin-mediated endocytosis. Insulin uptake rate was similar between type II and type I cells, and clathrin-mediated system would not be so important in both cells. Insulin was taken up by endocytosis in RLE-6TN cells, and the uptake was markedly stimulated by cationic polyamino acids. The stimulation of insulin absorption from the lung by polyamino acids was also observed *in vivo*. These results provide important information for the development of new pulmonary drug delivery systems.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2008 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2009 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：ドラッグデリバリー、経肺投与

1. 研究開始当初の背景

(1) 肺胞上皮は、形態的・機能的に異なる I

型細胞及び II 型細胞から構成されている。扁平上皮の I 型細胞は肺胞表面の 90% 以上を覆

っているが、立方上皮のⅡ型細胞は約10%を覆っているに過ぎない。しかし、細胞数ではⅡ型細胞はⅠ型細胞に比べて多く存在している。また、Ⅱ型細胞はⅠ型細胞の progenitor cell としての機能を有している。肺胞表面に存在するタンパク質の中で、特にアルブミンは肺浮腫時に肺胞腔内濃度が著しく上昇するため、病態からの回復にアルブミンの肺胞腔からのクリアランスが重要であると考えられている。さらに近年、インスリンの経肺投与製剤をはじめとして肺はタンパク質・ペプチド性医薬品の投与部位として注目されている。しかし、アルブミンやインスリンなどのタンパク質の肺胞腔から上皮細胞内への輸送機構に関して、特にⅠ型細胞及びⅡ型細胞間で比較検討した報告は乏しい。

(2) 肺は表面積が約 100 m<sup>2</sup>と広いこと、上皮細胞層が薄いこと、発達した脈管構造を持ち血液供給が多いことなどから、現在、注射剤に代わるタンパク質性医薬品の投与経路として注目されている。しかし、インスリンをはじめ肺におけるタンパク質の輸送機構については不明な点が多い。また、経肺投与時のインスリンの bioavailability は約 10~15%と報告されており、さらなる吸収改善が必要とされている。近年、カチオン性のペプチドを用いた高分子化合物の細胞内導入、吸収改善に関する研究が活発に行われている。カチオン性ポリアミノ酸である poly-L-ornithine (PLO)は gene delivery の際に有用とされているが、タンパク質やペプチドの細胞内への移行及び循環血中への移行に及ぼす影響については報告されていない。

## 2. 研究の目的

- (1)ラット初代培養肺胞上皮細胞を用いて、アルブミン及びインスリンの輸送活性や機構についてⅠ型細胞及びⅡ型細胞間で比較検討する。
- (2)ラット培養肺胞上皮細胞 RLE-6TN を用い、インスリンの輸送特性およびカチオン性ポリアミノ酸である poly-L-ornithine (PLO)の影響について検討する。

## 3. 研究の方法

- (1)ラット肺胞上皮Ⅱ型細胞の単離と初代培養：ラット(体重 120-200g)の肺を脱血・洗浄後、酵素処理(トリプシン及び DNase I)し、細胞懸濁液を得た。Percoll 不連続密度勾配遠心によりⅡ型細胞を精製単離した後、10%ウシ胎児血清、100 IU/mL penicillin、100 µg/mL streptomycin 及び 0.25 µg/mL fungizone 含有 DMEM/F-12 中で培養した。なお、Ⅱ型細胞の収量は約 30 x 10<sup>6</sup> cells/rat であり、cell viability は 90%以上であることを確認した。
- (2) RLE-6TN 細胞の培養：10%ウシ胎児血清

を含む DMEM/F-12 を用い、CO<sub>2</sub> インキュベーター(37℃、5%CO<sub>2</sub>-95%air)内でコンフルエントになるまで 6-7 日間培養した。

(3) mRNA 発現解析：細胞から total RNA を抽出し、各種 mRNA の発現レベルを SYBR<sup>®</sup> Green を用いた real-time PCR 法により解析した。

(4) DNA 定量：細胞を SDS により可溶化し、DNA 含量を Hoechst 333258 を用いて定量した。

(5) 細胞内移行解析：FITC で標識した基質を用い、0.1%Triton-X100 で可溶化した細胞サンプル中の蛍光強度を測定することにより細胞内取り込み量を評価した。また、タンパク定量は Lowry 法により行った。

(6) 共焦点レーザー顕微鏡解析：細胞内移行後の基質の局在について調べるため、単離したⅡ型細胞を glass bottom culture dish 上で 2 日間培養した。細胞を FITC で標識した基質とインキュベーションし、洗浄後、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM5 Pascal) で観察した。

(7) Pulse-chase 解析：2 日間培養したⅡ型細胞に FITC で標識した基質を添加し 60 分インキュベーションした後、基質を含まない緩衝液に置換後さらにインキュベーションしたサンプルを SDS-PAGE で分離した。泳動後のゲル中の蛍光をフルオロイメージアナライザー (FLA-2000) で検出することにより、インタクトな基質の消失・分解について解析した。

(8) In vivo 経肺投与方法：一晚絶食したラットをペントバルビタール(腹腔内投与)で麻酔後、気管支にカニューレーションを施し、呼吸に合わせてインスリン(75 µL/rat)を含む薬液を投与した。経時的に頸静脈から 200 µL ずつ採血を行い、遠心分離(10000 rpm, 3 分)後、Glucose CII Test Wako を用いて血漿中グルコース濃度を測定した。

## 4. 研究成果

(1) ラット初代培養肺胞上皮細胞を用いた検討

①初代培養条件の最適化：まず予備実験として、培養日数(1~8日)及び播種密度(1~8 x 10<sup>6</sup> cells/35-mm culture dish)を変化させてラットから単離した肺胞上皮Ⅱ型細胞を培養し、位相差顕微鏡で細胞形態の変化を観察した。その結果、Ⅱ型細胞を 5 x 10<sup>6</sup> cells/35-mm dish で播種し、2 日間培養した細胞はⅡ型細胞の形態(立方上皮、lamellar body の存在)を保持しており、また 2 x 10<sup>6</sup> cells/35-mm dish で播種し、6 日間培養した細胞はⅠ型様細胞へと形態転換(扁平化、lamellar body の消失)していることが確認された。次に、real-time PCR により、特異的に発現しているマーカーの mRNA 発現解析を行った。その結果、rat type I cell 40-kDa

protein 及び caveolin-1 などの I 型細胞マーカーの mRNA 発現は、培養 2 日後と比較して培養 6 日後の細胞において著しく高く (5~50 倍)、一方、II 型細胞マーカーの surfactant protein B 及び chemokine-induced neutrophilic chemoattractant-1 の mRNA 発現は、培養 6 日後において著しく低下していた (3~15% of day 2) (図 1)。以上の結果より、 $5 \times 10^6$  cells/35-mm dish で播種し 2 日間培養した細胞を II 型細胞、 $2 \times 10^6$  cells/35-mm dish で播種し 6 日間培養した細胞を I 型様細胞とした。

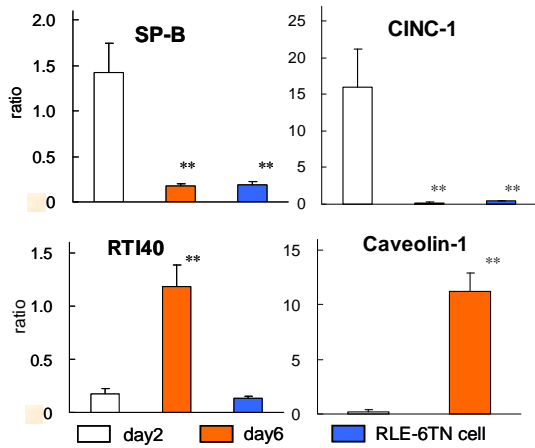


図 1. II 型細胞及び I 型様細胞における各種マーカーの mRNA 発現量の比較

\*\*p<0.01 vs. II 型細胞

② II 型細胞及び I 型様細胞における各種高分子物質の取り込み活性の比較: DNA 定量によりタンパク量当たりの細胞数を算出した結果、II 型細胞は  $13.2 \times 10^6$  cells/mg protein、I 型様細胞は  $5.7 \times 10^6$  cells/mg protein と算出された。この値を用いて、37°C における細胞 1 個当たりの取り込みクリアランスを比較したところ、両細胞共に FITC-アルブミン及び FITC-インスリンの取り込みクリアランスは、他の高分子 (IgG、トランスフェリン、4 および 70 kDa デキストラン) と比較して極めて高かったことから、アルブミンやインスリンの取り込み過程には何らかの特殊なシステムが関与することが示唆された (図 2)。

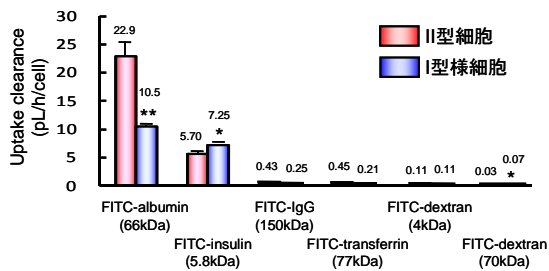


図 2. II 型細胞及び I 型様細胞における各種高分子物質の取り込み活性 (細胞 1 個当たり) の比較

\*p<0.05, \*\*p<0.01 vs. II 型細胞

さらに、FITC-アルブミンの II 型細胞における取り込みクリアランスは、I 型様細胞と比較して高かったのに対して、FITC-インスリンでは両細胞でほぼ同程度であった。

③アルブミン輸送特性の解析: II 型細胞及び I 型様細胞における FITC-アルブミンの取り込みは、37°C においてインキュベーション時間 60 分まではほぼ直線的に増加し、また 37°C での取り込みは 4°C に比べて顕著に高く、時間及び温度依存性を示した。FITC-アルブミンの温度依存的な取り込みは、共焦点レーザー顕微鏡観察によっても認められた。さらに、II 型細胞における FITC-アルブミン取り込みの濃度依存性について検討したところ飽和性を示し、Eadie-Hofstee plot 解析により、親和性の異なる 2 種の取り込み機構の存在が示唆された。次に高親和性輸送の寄与率が 98% を占める  $50 \mu\text{g/mL}$  FITC-アルブミンの II 型細胞及び I 型様細胞における取り込み機構について検討したところ、エネルギー代謝阻害剤及びレセプター介在性エンドサイトーシス阻害剤である bafilomycin A1 により阻害された。従って、FITC-アルブミンは II 型及び I 型様細胞においてエネルギー依存性のレセプター介在性エンドサイトーシスによって取り込まれていることが示唆された。レセプター介在性エンドサイトーシスは主に、クラスリン介在性及びカベオラ介在性エンドサイトーシスに分類される。そこで、クラスリン介在性エンドサイトーシス阻害剤である chlorpromazine 及び phenylarsine oxide の影響について検討したところ、II 型及び I 型様細胞における FITC-アルブミン取り込みは有意に阻害された。一方、カベオラ介在性エンドサイトーシス阻害剤は、両細胞における FITC-アルブミン取り込みに対して阻害効果を示さなかった (図 3)。以上の結果より、II 型細胞及び I 型様細胞いずれにおいても、FITC-アルブミンの取り込みにクラスリン介在性エンドサイトーシスが関与することが示された。なお pulse-chase 解析により、II 型細胞内に取り込まれたインタクトな FITC-アルブミンの細胞内半減期は約 80 分であり、経時的に消失することが明らかとなった。

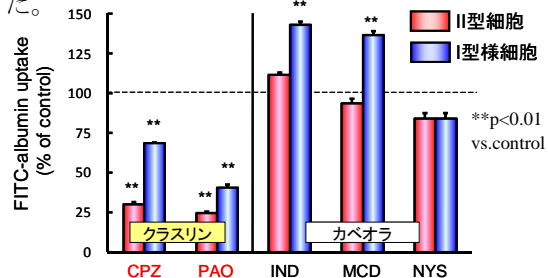


図 3. II 型細胞及び I 型様細胞における FITC-アルブミンのエンドサイトーシス経路の解析

CPZ: chlorpromazine, PAO: phenylarsine oxide, IND: indomethacin, MCD: methyl- $\beta$ -cyclodextrin, NYS: nystatin

④インスリン輸送特性の解析：II型細胞及びI型様細胞における FITC-インスリンの温度依存的な取り込み (37°C-4°C) を評価した結果、両細胞における FITC-インスリンの取り込みは、インキュベーション時間 60 分までほぼ直線的に増加した。また濃度依存性について検討したところ飽和性を示した。さらに両細胞における FITC-インスリンの取り込みは、エネルギー代謝阻害剤によって阻害されたが、レセプター介在性エンドサイトーシス阻害剤である bafiromycin A1 の阻害効果は、II型細胞においてのみ観察された。また、クラスリン及びカベオラ介在性エンドサイトーシス阻害剤で処置しても、両細胞における FITC-インスリン取り込みに影響は認められなかった。エンドサイトーシス経路はダイナミン依存性によってさらに分類されることから、その阻害剤である dynasore を用いて検討した。その結果、dynasore は両細胞の FITC-インスリン取り込みを阻害したが、その阻害効果はII型細胞において特に顕著であった (図4)。従って、II型細胞では主にダイナミン依存的な経路によって、I型様細胞ではダイナミン非依存的な経路によってエンドサイトーシスされることが示唆された。

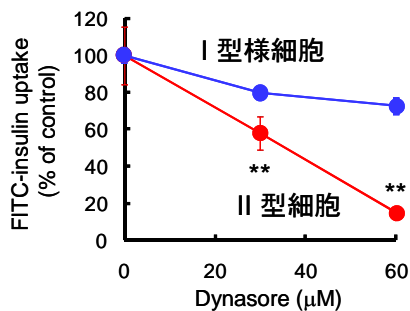


図4. II型細胞及びI型様細胞における FITC-インスリン取り込みに及ぼすダイナミン阻害剤 dynasore の影響

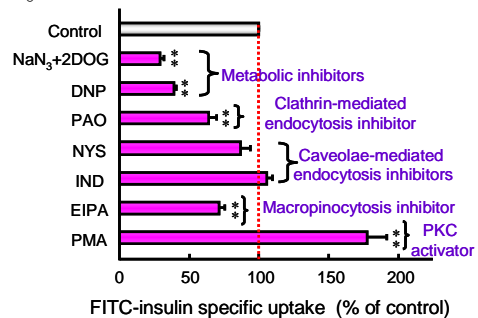
(2) ラット培養肺胞上皮細胞 RLE-6TN を用いた検討

①FITC-インスリンの細胞内移行特性：FITC-インスリンの RLE-6TN 細胞内移行特性を解析するにあたり、まず FITC-インスリン取り込みの時間および温度依存性について検討を行った。その結果、FITC-インスリンの取り込みは、37°Cにおいては 4°Cと比較して有意に高く、インキュベーション 60 分までほぼ直線性が観察され、FITC-インスリンの取り込みに時間および温度依存性が示された。この結果から、阻害剤処置の実験に関しては、37°Cにおける取り込み量から 4°Cにおける細胞表面結合量を引いた値を温度依存的な取り込みとして評価した。さらに、FITC-インスリンの輸送メカニズムを検討したところ、エネルギー依存的なエンドサイトーシスが

関与すること、そのエンドサイトーシスにはカベオラやマクロピノサイトーシスは関与せず、一部クラスリン介在性エンドサイトーシスが関与することが示されたが、その寄与は小さいものであった。

②FITC-インスリンの細胞内取り込みに及ぼす PLO の影響：カチオン性のポリアミノ酸である PLO は生理的 pH では正に帯電している。そのため、DNA など生理的 pH で負に帯電している物質と静電的に結合し、複合体を形成することで DNA の細胞内への導入効率を高めることができる化合物として注目されている。そこで負電荷を有するインスリンに対しても、PLO を共存させることによって細胞内移行量を増加させることができるのではないかと考えた。PLO 共存下では、FITC-インスリンの取り込みは有意に上昇し、ポリアミノ酸の濃度 10 μg/mL 付近で細胞内取り込み量が最大となることが示された。

③PLO 共存下の FITC-インスリンの取り込みメカニズム：PLO 共存下の FITC-インスリンの取り込みに及ぼすエネルギー代謝阻害剤 (DNP, NaN<sub>3</sub>) および各種エンドサイトーシス阻害剤の影響について検討した。その結果、PLO 共存下における FITC-インスリンの取り込みにエネルギー依存性が示され、また PLO 非共存下と同様にカベオラは関与せず、クラスリン介在性エンドサイトーシスが一部関与することが示唆された。さらに、マクロピノサイトーシスの特異的阻害剤である EIPA 処置により、PLO 非共存下と異なり EIPA の濃度依存的に FITC-インスリンの取り込み量は減少した (図5)。この結果から、PLO 共存によって促進された FITC-インスリンの取り込みには、マクロピノサイトーシスが新たな取り込みメカニズムとして関与していることが示された。



NaN<sub>3</sub>:Sodium azide, 2-DOG:2-Deoxy-D-glucose, DNP:2,4-Dinitrophenol, PAO:Phenylarsine oxide, NYS:Nystatin, IND:Indomethacin, EIPA:5-(N-ethyl-N-isopropyl) amiloride, PMA:Phorbol 12-myristate 13-acetate

図5. PLO 共存下で促進された RLE-6TN 細胞における FITC-インスリン取り込みに及ぼす各種エンドサイトーシス阻害剤の影響

④FITC-インスリンの細胞内移行後の局在と分解・消失：細胞内移行後の FITC-インスリンの局在について、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。37°Cにおいて、PLO 共存下、非共存下のいずれの場合も FITC-インスリンは細胞内に点状に取り込まれ、リソソームマーカーとの共局在も認められた。従って、PLO 共存下においても非共存下と同様に細胞内移行後の FITC-インスリンは一部リソソームへ移行していることが示された。細胞内移行後の FITC-インスリンの分解・消失について PLO 共存下、非共存下で Pulse-chase 解析を行った。その結果、インキュベーション時間依存的に細胞内のインタクトな FITC-インスリンは減少し、FITC-インスリンの分解が経時的に進行していることが示された。片対数プロットの結果から、インタクトな FITC-インスリンは RLE-6TN 細胞内から 1 次速度過程に従い消失することが示され、細胞内消失半減期はポリアミノ酸非共存下で 77 分、PLO 共存下で 143 分であった。従って、PLO 共存下では細胞内における分解速度が低下することが示唆された。また、Transwell 上に培養した RLE-6TN 細胞にあらかじめ FITC-インスリンを取り込ませ、洗浄後、細胞内から basal 側への移行について検討した。その結果、basal 側への FITC-インスリンの放出が認められ、apical 側から取り込まれた FITC-インスリンの細胞内からの消失には細胞内での分解に加えて、一部 basal 側への放出(トランスサイトシス)が関与することが示唆された。

⑤In vivo インスリン経肺投与における PLO の影響：in vivo におけるインスリンの経肺吸収に及ぼす PLO の影響について検討した。その結果 PLO を併用投与することにより、インスリン単独投与に比べ有意な血中グルコース濃度の低下が観察された (図 6)。area above the curve(AAC)を求めたところ、促進率は 1.9 倍と算出された。このように、PLO 共存によるインスリンの吸収改善効果が in vivo において観察された。

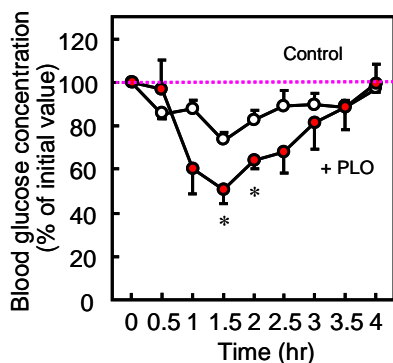


図 6. In vivo 経肺投与法によるインスリンの吸収 (血糖降下作用) に及ぼす PLO 併用投与の影響

以上の研究成果より、肺胞表面の約 10% を覆っているに過ぎない II 型細胞が、タンパク質、特にアルブミンの取り込みに重要な役割を果たしているという、新たな知見を得ることができた。さらにアルブミンの場合、II 型細胞において取り込み活性が高くクラスリン介在性エンドサイトーシスが関与するが、インスリンの場合は両細胞で類似した取り込み活性が見られ、クラスリン系の関与は小さいことなど、基質となるタンパク質によって挙動が大きく異なることが判明した。さらに PLO などのカチオン性ポリアミノ酸は、in vitro のみならず in vivo においてもインスリン吸収促進作用を示し、経肺吸収促進剤としての有用性が示唆された。これらの知見は、新たな経肺投与システムの開発において、重要な科学的基盤を与えるものである。

#### 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 3 件) いずれも査読有

- ① Ikehata, M., Yumoto, R., Kato, Y., Nagai, J. and Takano, M.: Mechanism of insulin uptake in rat alveolar type II and type I-like epithelial cells. *Biol. Pharm. Bull.*, **32** (10), 1765-1769 (2009)
- ② Ikehata, M., Yumoto, R., Nakamura, K., Nagai, J. and Takano, M.: Comparison of albumin uptake in rat alveolar type II and type I-like epithelial cells in primary culture. *Pharm. Res.*, **25** (4), 913-922 (2008)
- ③ Tagawa, M., Yumoto, R., Oda, K., Nagai, J. and Takano, M.: Low-affinity transport of FITC-albumin in alveolar type II epithelial cell line RLE-6TN. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **23** (5), 318-327 (2008)

[学会発表] (計 11 件)

- ① 湯元良子、ラット肺胞上皮細胞の形態・機能に及ぼす喫煙関連物質の影響、日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 28-30 日、岡山桃太郎アリーナ
- ② 加藤祐貴、肺胞上皮細胞の viability と遺伝子発現に及ぼす喫煙関連物質の影響、第 48 回日本薬学会中国四国支部学術大会、2009 年 11 月 7-8 日、アステイトくしま
- ③ 湯元良子、肺胞上皮 II 型細胞と I 型細胞における物質輸送システムの発現・機能の比較解析、日本膜学会第 31 年会、2009 年 5 月 21-22 日、東京理科大学森戸記念館
- ④ 加藤祐貴、ラット肺胞上皮 II 型・I 型細胞における P-glycoprotein の発現・機

能の比較解析とステロイド処置の影響、  
日本薬学会第129年会、2009年3月26-28  
日、京都国際会館

- ⑤ 加藤祐貴、ラット肺胞上皮細胞における  
P-glycoproteinの発現・機能とステロイ  
ドの影響、第47回日本薬学会中国四国  
支部学術大会、2008年11月8-9日、岡  
山コンベンションセンター
- ⑥ Mika Ikehata, Mechanism of Insulin  
Uptake in Rat Alveolar Type II and Type  
I-like Epithelial Cells in Primary  
Culture, 第23回日本薬物動態学会年会、  
2008年10月29日-11月1日、熊本市民  
会館
- ⑦ Keisuke Oda, MECHANISM OF INSULIN  
UPTAKE AND EFFECT OF POLY (AMINO ACID)S  
IN RAT ALVEOLAR TYPE II EPITHELIAL  
CELL LINE RLE-6TN、第23回日本薬物  
動態学会年会、2008年10月29日-11  
月1日、熊本市民会館
- ⑧ 池畑美香、ラット肺胞II型-I型上皮細  
胞におけるアルブミンの取り込み機構  
と細胞内挙動、日本薬学会第128年会、  
2008年3月26-28日、横浜みなとみらい  
ホール
- ⑨ 小田啓祐、肺胞上皮細胞 RLE-6TN にお  
けるインスリンの輸送機構解析、日本薬  
学会第128年会、2008年3月26-28日、  
横浜みなとみらいホール
- ⑩ 湯元良子、肺胞上皮細胞におけるアルブ  
ミンの輸送機構、膜シンポジウム 2007、  
2007年11月14-15日、山口大学工学部
- ⑪ Maki Tagawa, Endocytosis of albumin and  
insulin in alveolar type II epithelial cell line  
RLE-6TN : International Society for the  
Study of Xenobiotics (ISSX) 8<sup>th</sup>  
International Meeting, 2007年10月8-12  
日、仙台国際センター

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高野 幹久 (TAKANO MIKIHISA)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：20211336

### (2) 研究分担者 なし

### (3) 連携研究者

永井 純也 (NAGAI JUNYA)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

(H19：研究分担者)

研究者番号：20301301

湯元 良子 (YUMOTO RYOKO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

(H19：研究分担者)

研究者番号：70379915