

平成 22年 5月 14日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20810041
 研究課題名（和文）新規人工調製肺サーファクタントのインテリジェント・ナノ医薬としての
 試み
 研究課題名（英文）Investigation on Newly Synthetic Pulmonary Surfactant from the
 Biophysical Aspect
 研究代表者
 中原 広道（NAKAHARA HIROMICHI）
 長崎国際大学・薬学部薬学科・助教
 研究者番号：00513235

研究成果の概要（和文）：私達が考案した人工調製型肺サーファクタント(LS)は既存薬 Surfacten に匹敵する結果が得られました。またホスファチジルグリセロール成分(陰イオン)とモデルペプチド(陽イオン)が静電的相互作用により特異的に相互作用することを突き止めました。さらにこの静電的相互作用は、膜表面積の減少に伴う2次構造変化(α -ヘリックスから β -シート構造)に耐性を示します。これらの結果 LS 機能・機序に関して新たな知見を与えます。

研究成果の概要（英文）：As a result of in vitro and in vivo examinations, our pulmonary surfactant preparations show the similar effect to Surfacten. In addition, an electrostatic interaction between PG (phosphatidylglycerol) and peptide (Hel 13-5) prevents irreversible transformation for the peptide from α -helix to β -sheet structures.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,320,000	396,000	1,716,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,520,000	756,000	3,276,000

研究分野：界面科学、膜化学、物理化学

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ化学 ・ ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：表面・界面物性、複合材料、肺サーファクタント、ナノ医薬、超薄膜

1. 研究開始当初の背景

肺サーファクタント(LS)は肺胞表面を覆い、肺胞拡張時の負担(仕事)軽減、肺胞収縮時の虚脱防止、外来性ウイルス等に対する一次免疫に関与しています。肺胞II型細胞で合成・分泌されたLSはラメラ構造、管状ミエリン構造へと形態を変え、肺胞表面の気/液界面に

吸着し単分子膜を形成します。呼吸運動に伴ってLS単分子膜が巧みに表面活性作用を制御することにより、肺機能の恒常性が保たれています。このLSが欠乏すると先天性呼吸窮迫症候群(NRDS)や後天性呼吸窮迫症候群(ARDS)を発症します。現在、この治療薬としては動物由来のものが主流ですがアレル

ギーを引き起こす可能性、牛海綿状脳症 (BSE)等の問題からその使用が懸念されています。またこの動物由来型薬物は抽出・精製過程に莫大な労力を伴うため、11 万円/vial(120mg)と非常に高価で、医療費問題の一端を担っており、また NRDS 以外は保険診療適用外の現状です。そこで私達は一連の疎水性・親水性バランスを持つアミノ酸 18 残基からなるモデルペプチドを新規に合成し、これらペプチドと生体膜との相互作用について研究を行ってきました。本研究の推進は、単に新規 RDS 治療薬の開発に留まらず、医療費負担の軽減、BSE 対策といった社会的問題、さらには広範な呼吸器疾患 (喘息、SARS、COPD 等)への適用拡大へ大きく貢献できると考え、研究に着手しました。

2. 研究の目的

肺サーファクタント (LS)に関連した研究は特に最近精力的に行われています。しかし動物抽出型 LS (Surfacten 等)についての報告は多いですが、人工調製型についての報告は少ないのが現状です。そこで本研究では種々の人工調製型 LS と Surfacten との in vivo 肺内物性 (ラット肺)を比較検討し、in vitro と in vivo 物性の相関関係を明確にすることを目的とします。その上で、以下の LS 調製物について研究を進展させ、呼吸機能のさらなる向上、また呼吸に伴う膜分子の排除メカニズムの解明及び応用面へと展開致します。

- (1) 人工調製型 LS (DPPC/PG/PA/He1 13-5)
- (2) 部分フッ素化両親媒性物質を導入したフッ素ハイブリッド型人工調製 LS
- (3) D 体アミノ酸置換型 He1 13-5 を含有した人工調製 LS

3. 研究の方法

(1)人工調製 LS は呼吸における肺胞内表面積の圧縮・拡張の負担を和らげる作用を示します。その負担の軽減は LS の表面張力低下作用に基づくため、LS の研究 (in vitro) は一般的に Modified Wilhelmy-Balance 手法が頻用されています。この手法は呼吸における肺胞内表面積の連続的変化を自由に行うことができ、また同時にその面積での表面張力変化及び配向変化に感度の良い表面電位変化を捉えることができます。さらに肺胞内は気/液界面が存在し、この状況も Modified Wilhelmy-Balance 手法によりシミュレート可能です。また BAM (ブリュースター角顕微鏡)、FM (蛍光顕微鏡)により表面積の圧縮・拡張時における形態像 (マイクロスケール)を観察することができます。さらに、一定圧力で基板に累積した LB 膜を AFM (原子間力顕微鏡)で観察することにより形態像 (ナノスケール)、位相差像を同時に解析できます。そのため人工調製 LS の in vitro 物性の測定は Modified

Wilhelmy-Balance システムによって行います。

(2) まず成熟 Wistar ラットに生理食塩水で肺洗浄を行い、肺サーファクタント欠乏モデルを作製します。その欠乏モデルに対し、100%酸素による人工換気下で、LS 調製物を気管内投与し、連続的に気道内圧 P (cmH₂O)、一回換気量 V (mL/kg)を微小呼吸量測定システムにより測定します。これら測定値から経時的肺コンプライアンス (一回換気量/気道内圧)の算出が可能となり、肺機能の回復や肺の柔軟性を評価することができます。またその後、ラット肺を気胸させ、静的な P (肺内圧) -V (肺容量) 曲線を測定します。結果として得られた P-V 曲線を in vitro π -A ヒステリシス曲線と比較対比し、in vitro / in vivo 間の相関関係について評価を行います。

4. 研究成果

人工調製型肺サーファクタント脂質の基本成分は DPPC (ジパルミトイルホスファチジルコリン)/PG (ホスファチジルグリセロール)/PA (パルミチン酸) (=68:22:9, wt/wt/wt) を用いました。これは、羊水中の脂質組成と同様であり、最も有効な肺サーファクタント脂質混合物として多くの研究者によって用いられ、また臨床的に RDS 治療薬にも適用されています。これまでに私達は in vitro で人工調製型肺サーファクタント (DPPC/PG/PA/He1 13-5) と RDS 治療薬 (Surfacten) の 2 次元物性比較を行いました。種々の表面物性解析法 (π -A 等温線、 ΔV -A 等温線、Hysteresis 曲線、蛍光顕微鏡画像)で比較検討した結果、表面物性においてこの人工調製型肺サーファクタントは Surfacten に匹敵する結果が得られました。具体的な成果を以下に列記します。

(1) 人工調製型肺サーファクタント系において PG 成分 (陰イオン) と He1 13-5 (陽イオン) が静電的相互作用により特異的に相互作用することを突き止めました。これは肺サーファクタントメカニズム (界面を介した吸着・脱着機能) に関して新たな知見を与えます。

(2) in vitro-in vivo データを関連付けるために、肺内物性 (in vivo) に関して比較検討を行いました。現段階のデータを統合すると実際の肺内物性においてもこの調製物は Surfacten に匹敵することが見出されました。これは呼吸における分子レベルでの肺機能メカニズムの解明及び SP-B、SP-C 模倣ペプチドを含有する新規 RDS 治療薬の開発等に大きく貢献すると考えられます。

(3) 3種のLSモデル膜(DPPC/He1 13-5, DPPG/He1 13-5, DPPC/DPPG/He1 13-5)を作製し、この特異的相互作用が如何にして He1 13-5 ペプチドの2次構造を制御しているのかについて研究を行いました。この結果、DPPG と He1 13-5 間の静電的相互作用は、膜表面積の減少に伴う2次構造変化(α -ヘリックスから β -シート構造)に耐性を示すことが分かりました。これはLS機能・機序(界面を介した吸着・脱着機能)に関して新たな知見を与えます。

(4) 静電的相互作用の無い DPPC/He1 13-5 の LS では完全に α -ヘリックスから β -シート構造に変化しました。

(5) 肺サーファクタント膜の圧縮・拡張により α -ヘリックス含量は約80%から30%程度まで減少しました。

(6) α -ヘリックスから β -シート構造への2次構造変化はDPPG成分の有無に関わらず、不可逆的な変化を示しました。

本研究プロジェクトの成果は呼吸における分子レベルでの肺機能・機序の解明及び模倣ペプチドを含有する新規RDS治療薬の開発等に大きく貢献すると考えられます。

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8件)

- ① 中原広道, 李相男, 柴田 攻, Specific interaction restrains structural transitions of an amphiphilic peptide in pulmonary surfactant model systems: An in situ PM-IRRAS investigation, *Biochim. Biophys. Acta* 1798 (2010) 1263-1271, 査読有り
- ② 横山宏樹, 中原広道, 柴田 攻, Miscibility and phase behavior of DPPG and perfluorocarboxylic acids at the air-water interface, *Chem. Phys. Lipids*. 161 (2009) 103-114, 査読有り
- ③ 中原広道, 新規人工調製肺サーファクタントの開発に向けて, *Colloid & Interface Communication* 34 (2009) 27-29, 査読有り
- ④ 中原広道, 津地みなみ, 佐藤由紀子, Krafft M.P., 柴田 攻, Langmuir monolayer miscibility of single-chain partially fluorinated amphiphiles with tetradecanoic acid, *J. Colloid Interface Sci.* 337 (2009) 201-210, 査

読有り

- ⑤ 横山宏樹, 中原広道, 中川隆博, 下野智, 居石邦彦, 柴田 攻, Miscibility behavior of two-component monolayers at the air-water interface: Perfluorocarboxylic acids and DMPE, *J. Colloid Interface Sci.* 337 (2009) 191-200, 査読有り
- ⑥ 中原広道, 李相男, 柴田 攻, Pulmonary surfactant model systems catch the specific interaction of an amphiphilic peptide with anionic phospholipid, *Biophys. J.* 96 (2009) 1415-1429, 査読有り
- ⑦ 中原広道, Dudek A., 中村幸弘, 李相男, Chang C.-H., 柴田 攻, Hysteresis behavior of amphiphilic model peptide in lung lipid monolayers at the air-water interface by an IRRAS measurement, *Colloids Surf. B* 68 (2009) 61-67, 査読有り.
- ⑧ 雪竹 浩, 中村幸弘, 中原広道, 柴田 攻, 李相男, Development of low cost pulmonary surfactants composed of a mixture of lipids or lipids-peptides using higher aliphatic alcohol or soy lecithin, *Colloids Surf. B* 66 (2008) 281-286, 査読有り

[学会発表] (計36件)

- ① 中原広道, 気/液界面における肺サーファクタントモデルペプチドの二次構造解析, 日本薬学会第130年会, 岡山, 2010年3月28日
- ② 中原広道, 偏光変調赤外反射吸収法による人工肺サーファクタント膜配向の直接測定, 第26日本薬学会九州支部大会, 福岡, 2009年12月13日
- ③ 中原広道, PM-IRRAS法による人工肺サーファクタントのペプチド二次構造変化, 物理化学インターカレッジ(兼油化学界面科学部会九州地区講演会), 福岡, 2009年12月5日
- ④ 柴田 攻, ペルフルオロカルボン酸と生体リン脂質とのLangmuir単分子膜挙動, 物理化学インターカレッジ(兼油化学界面科学部会九州地区講演会), 福岡, 2009年12月5日
- ⑤ 中原広道, 部分フッ素化両親媒性物質のLangmuir単分子膜挙動, 物理化学インターカレッジ(兼油化学界面科学部会九州地区講演会), 福岡, 2009年12月5日
- ⑥ 師井義清, Examination of Surface Adsorption of Soluble Surfactants by Surface Potential Measurement at the Air/Solution Interface, 第3回アジア・コロイド及び界面化学会議, 濟州島,

- 韓国, 2009年10月13日
- ⑦ 杉原剛介, Thermodynamic Studies on Monolayer Behavior of Multi-component Mixed Systems of a Bile Acid with an Animal Sterol and Different Sterols and a Stanol, 第3回アジア・コロイド及び界面化学会議, 済州島, 韓国, 2009年10月12日
- ⑧ 中原広道, Low Cost Pulmonary Surfactants with Highly Aliphatic Alcohol and Soy Lecithin Are Comparable to Surfacten in vitro and in vivo, 第3回アジア・コロイド及び界面化学会議, 済州島, 韓国, 2009年10月12日
- ⑨ 中原広道, Interfacial behavior of an amphiphilic peptide in pulmonary surfactant model systems: An in situ PM-IRRAS study, 第3回アジア・コロイド及び界面化学会議, 済州島, 韓国, 2009年10月11日
- ⑩ 柴田 攻, フッ化カルボン酸と生体リン脂質との Langmuir 単分子膜挙動: マクロ及びナノスケールの視点から, 第62回コロイドおよび界面化学討論会, 岡山, 2009年9月18日
- ⑪ 中原広道, 両親媒性ペプチドを用いた低価格化人工調製肺サーファクタントの開発, 第62回コロイドおよび界面化学討論会, 岡山, 2009年9月18日
- ⑫ 中原広道, 部分フッ素化両親媒性物質と飽和脂肪酸の二成分単分子膜挙動, 第62回コロイドおよび界面化学討論会, 岡山, 2009年9月18日
- ⑬ 森岡多佳子, 人工肺サーファクタントにおける両親媒性ペプチドの二次構造と配向変化, 第48回日本油化学会年会, 名古屋, 2009年9月11日
- ⑭ 森岡多佳子, 大豆由来脂質使用の人工調製肺サーファクタントの薬効評価, 第48回日本油化学会年会, 名古屋, 2009年9月11日
- ⑮ 吉野辰馬, 胆汁酸/コレステロール/植物ステロール3成分混合系の単分子膜挙動, 第48回日本油化学会年会, 名古屋, 2009年9月11日
- ⑯ 中原広道, Evaluation of low cost pulmonary surfactants composed of highly aliphatic alcohol and soy lecithin, 第23回ヨーロッパ・コロイド及び界面化学会議, アンタリヤ, トルコ, 2009年9月8日
- ⑰ 中原広道, Polarization modulation-infrared reflection adsorption spectroscopy of an amphiphilic peptide in pulmonary surfactant model systems, 第23回ヨーロッパ・コロイド及び界面化学会議, アンタリヤ, トルコ, 2009年9月8日
- ⑱ 柴田 攻, 部分フッ素化両親媒性物質と生体リン脂質の Langmuir 膜混和機構の解明, 日本薬学会第129年会, 京都, 2009年3月26日
- ⑲ 中原広道, 人工調製肺サーファクタント系におけるリン脂質選択性の解明, 日本薬学会第129年会, 京都, 2009年3月26日
- ⑳ 中原広道, 人工調製肺サーファクタントに関する研究, 第2回東京フォーラム in 東京~九州からの情報発信~, 東京, 2008年12月16日
- ㉑ 柴田 攻, 単鎖部分フッ素化合物と DPPC の Langmuir 膜挙動, 第25回日本薬学会九州支部大会, 延岡, 2008年12月7日
- ㉒ 中原広道, 人工肺サーファクタント系におけるペプチドと酸性リン脂質間の選択的界面挙動, 第25回日本薬学会九州支部大会, 延岡, 2008年12月7日
- ㉓ 井上雄史, デオキシコール酸と各種ステロール類との混合系の単分子膜挙動—その3, 第47回日本油化学会年会, 東京, 2008年9月18日
- ㉔ 柴田 攻, 部分フッ素化両親媒性物質と異種親水基を持つリン脂質の混和挙動, 第47回日本油化学会年会, 東京, 2008年9月18日
- ㉕ 師井義清, 表面電位測定による界面活性剤溶液の空気/溶液界面吸着に関する新しい解釈, 第47回日本油化学会年会, 東京, 2008年9月18日
- ㉖ 中原広道, 人工肺サーファクタント系におけるモデルペプチド-脂質間の選択的相互作用, 第47回日本油化学会年会, 東京, 2008年9月18日
- ㉗ 中原広道, 赤外反射吸収分光法 (IRRAS) を利用した人工肺サーファクタントのヒステレシス挙動, 第47回日本油化学会年会, 東京, 2008年9月18日
- ㉘ 師井義清, 表面電位測定による可溶性活性剤溶液の空気/溶液界面吸着に関する検討, 第61回コロイドおよび界面化学討論会, 福岡, 2008年9月9日
- ㉙ 中原広道, フッ素化カルボン酸膜を介した水の蒸発に関する速度論的解析, 第61回コロイドおよび界面化学討論会, 福岡, 2008年9月9日
- ㉚ 師井義清, 非イオン性界面活性剤 (C14E8) ミセルに関する可溶化, 第61回コロイドおよび界面化学討論会, 福岡, 2008年9月9日
- ㉛ 中原広道, 部分フッ素化両親媒性物質とジパルミトイルリン脂質類の Langmuir 単分子膜挙動, 第61回コロイドおよび界面化学討論会, 福岡, 2008年9月8日

- 日
- ③② 中原広道, 赤外反射吸収分光法 (IRRAS) による人工肺サーファクタントの界面機能解析, 第 61 回コロイドおよび界面化学討論会, 福岡, 2008 年 9 月 7-9 日
- ③③ 中原広道, 人工肺サーファクタントにおける表面電位のヒステレシス特性, 第 61 回コロイドおよび界面化学討論会, 福岡, 2008 年 9 月 8 日
- ③④ 柴田 攻, Effect of Head Groups in Phospholipids on Miscibility with Partially Fluorinated Amphiphiles at the Air-Water Interface, 第 22 回ヨーロッパ・コロイド及び界面化学会議, クラコフ, ポーランド, 2008 年 9 月 2 日
- ③⑤ 中 原 広 道, Role of phosphatidylglycerol in pulmonary surfactant preparations with an amphiphilic peptide at the air-water interface, 第 22 回ヨーロッパ・コロイド及び界面化学会議, クラコフ, ポーランド, 2008 年 9 月 2 日
- ③⑥ 中原広道, Hysteresis behavior of amphiphilic model peptide in DPPC monolayers at the air-water interface: An IRRAS measurement, 第 22 回ヨーロッパ・コロイド及び界面化学会議, クラコフ, ポーランド, 2008 年 9 月 2 日

[図書] (計 1 件)

- ① 中原広道, 李 相男, 柴田 攻, Influence of pulmonary surfactant protein mimics on model lung surfactant, In Biobased Surfactants and Detergents: Synthesis, Properties, and Applications, D.G. Hayes, D. Kitamoto, D.K.Y. Solaiman, R.D. Ashby, Eds., AOCS Press, Urbana, IL, USA, 2009, pp157-190.

[その他]

ホームページ:
長崎国際大学
<http://www.niu.ac.jp/>

ホームページ:
長崎国際大学・薬学部・薬品物理化学研究室
<http://www.niu.ac.jp/~pharm1/lab/physchem/index.html>

ホームページ:
研究開発支援総合ディレクトリ (ReaD)
<http://read.jst.go.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中原 広道 (NAKAHARA HIROMICHI)
長崎国際大学・薬学部薬学科・助教
研究者番号: 00513235

(2) 研究分担者
()

研究者番号:

(3) 連携研究者
柴田 攻 (SHIBATA OSAMU)
長崎国際大学・薬学部薬学科・教授
研究者番号: 10117129