

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2009～2011

課題番号：21680051

研究課題名（和文）食品機能成分の体内動態特性に基づく薬剤性肺障害の予防

研究課題名（英文）Prevention of drug-induced lung injury on the basis of the pharmacokinetic profiles of food factors

研究代表者 板垣 史郎 (ITAGAKI SHIRO)

弘前大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：00360925

研究成果の概要（和文）：本研究では、日本人で発症率が極めて高く重篤な経過を辿る医薬品副作用である薬剤性肺障害について、食生活という観点からその予防に資する基礎科学情報を創出することを目指した。今回、副作用に重篤な間質性肺炎をもつ抗不整脈薬アミオダロンが肺細胞ならびに消化管上皮細胞に局在するトランスポーター OATP2B1 の発現を誘導することを明らかにすることができた。今後、OATP2B1 発現誘導の分子機構を明らかにし、薬剤性肺障害を予防する標的分子としての可能性を検討していきたいと考えている。

研究成果の概要（英文）：In Japanese, the frequency of drug-induced severe lung injury is quite higher than that of other species. The aim of this study is to create practical and reliable information about prevention of drug-induced lung injury on the basis of the pharmacokinetic profiles of food factors. Amiodarone is a potent drug used in the treatment of serious supraventricular and ventricular tachyarrhythmias. However, its wide clinical use and long-lasting administration are precluded by extensive adverse effects such as interstitial pneumonia. We have found that amiodarone induces organic anion transporter (OATP2B1) expression at the alveolar epithelium and intestinal membrane and enhances absorption of organic anion compounds.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2010年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2011年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：OATP2B1

1. 研究開始当初の背景

食生活は患者の予後を規定しうる重要な因子の一つである。一例として、わが国の食生活の欧米化に伴う蛋白質摂取量の増加は、わが国で長い間報告の無かったオルニチントランスカルバミラーゼ欠乏症の発症を急

増させた(Matsuda et al., J Med Genet. 33: 645-648 (1996))。一方、食事を楽しむことは患者の生活の質(Quality of life/QOL)、ひいては生きる意欲を高めることにつながる。さらに、食事は多様な機能成分の摂取経路でもある。食品機能成分がその作用を発揮

するためには、機能分子が標的部位に到達する必要がある。この過程はトランスポーターをはじめ、様々な動態関連因子により制御されている。

薬剤の副作用もまた、患者の予後を大きく左右する。欧米諸国に比べ、日本において発症率が飛びぬけて高く、重篤な経過を辿る副作用として薬剤性肺障害がある (Inoue et al., Lancet, 361: 137-139 (2003))。世界に先駆け日本で初めてスピード承認された肺癌分子標的治療薬ゲフィチニブは間質性肺炎の報告が相次ぎ、販売開始後わずか3ヶ月という異例の早さで緊急安全性情報が発出された。ゲフィチニブ以降、薬剤による急性肺障害が新聞の社会面をにぎわせる機会が多くなった。直近でも2008年9月25日にインターフェロンによる間質性肺炎に関して添付文書改定の指示が出されている。しかしながら、日本人が薬剤性肺障害を発症しやすい理由は全く明らかになっていない。

致死率が50~60%と極めて高いびまん性肺胞障害 (DAD) タイプをもたらす薬剤が日本人に肺障害をきたす頻度が高いこと (阿部ら、成人病と生活習慣病, 37:284-287 (2007))、上記薬剤の他にも、抗菌薬、漢方薬、はては総合感冒薬など処方頻度が極めて高い薬剤においてもDADタイプによる死亡例の報告があること、これらの背景を考えた場合、わが国においては科学的根拠に基づく薬剤性肺障害の予防・治療法の確立は急務と言える。

欧米では薬物による肺障害はほとんど問題となっていないこと、呼吸器領域を本来の薬効とする薬剤による例は多くはないことから、その研究は遅々として進展していない。また、台湾、韓国、中国などでは致死性の肺障害の発症頻度は高くはなく、急性肺障害の高い頻度はアジア人に共通のものではなく、日本人特有である可能性が示唆されている。

従来の薬剤性肺障害に関する研究は直接的な細胞障害メカニズムに焦点を当てたものが殆どであった。これに対し、筆者は多剤無効性の難治性・致死性不整脈に適応されるアミオダロン (AMD) をモデル化合物として肺細胞 A549 への輸送機構を解析し、A549 における AMD およびその代謝物 N-モノデスエチルアミオダロン (DEA) の取り込みに薬物トランスポーター OATP2B1 が関与していること、OATP2B1 の阻害及びノックダウンにより、AMD、DEA の細胞障害性が抑制されることを明らかにした (Seki et al., Biochim. Biophys. Acta, 1788:911-917 (2009))。これは、AMD 投与時の肺障害発症機序を薬物輸送の観点から明らかにした初めての例であり、薬物の肺細胞送達性が薬剤性肺障害の発症を担っている可能性を示したと言える。

以上の社会的・学術的背景を踏まえ、筆者は薬物服用後の肺移行を食品機能性成分に

よって効率的・選択的に抑制することで、致死的な副作用発現を予防できるとの仮説を着想するに至った。

2. 研究の目的

前述の社会的・学術的背景を踏まえ、本研究では、日本人で発症率が極めて高く重篤な経過を辿る医薬品副作用である薬剤性肺障害について、患者の日常生活の一環である食生活という観点からその予防に資する基礎科学情報を創出することを目指した。

3. 研究の方法

ラット肺よりラットの肺組織から II 型細胞を単離し、培養により I 型様細胞へと転換させた。SD ラットは日本チャールズリバーより購入した。ラット肺組織から単離した細胞が II 型細胞の性質を有していることを、トリパンプルー染色ならびに変法パパニコロウ染色により確認した。培養した細胞が I 型細胞の性質を保持していることを、形態観察ならびにマーカー遺伝子の mRNA 測定にて確認した。単離した II 型細胞を Transwell 上に播種し、基質取り込み実験、MTT assay 等に用いた。

A549 細胞は American Type Culture Collection、Caco-2 細胞は理化学研究所バイオリソースセンターより購入し、培養は定法にて行った。

mRNA の定量は Real-Time PCR 法にて、発現蛋白質の定量はウエスタンブロッティングにて行った。細胞中、組織中の化合物の定量は HPLC もしくは液体シンチレーションにて行った。標的遺伝子のノックダウンは siRNA を用いて行った。

4. 研究成果

現在のところ、薬物の肺蓄積性に関する研究は *in vivo* での肺蓄積量の評価がほとんどであり、その詳細なメカニズムを解明しようとする試みは皆無に近い。この原因として、A549 など肺胞上皮由来の培養細胞では Tight Junction (TJ) 形成が不十分であるため、多くの臓器に関して *in vitro* 評価モデルとして汎用されている培養細胞が肺胞上皮の機能評価には適さないことが挙げられる。一方で、正常組織の肺胞上皮細胞は細胞間に TJ を形成し、完全な単層膜構造を再現できる。そこで、ラットから得た正常肺胞上皮細胞を用いて、生体内の肺胞上皮の微小環境を正確に反映した *in vitro* モデルの構築に取り組む。正常組織より単離した肺胞上皮細胞は細胞間に Tight Junction を形成し、完全な単層膜構造を再現できる。そこで、正常肺胞上皮細胞を用いて生体内の機能をより正確に反映した *in vitro* 系を構築することとした。肺胞上皮細胞はガス交換を担う I 型細胞と、

免疫修飾能をはじめ多彩な活性を有する II 型細胞に分類される。II 型細胞は 1 週間程度の培養により I 型様細胞に分化するため、ラットの肺組織から II 型細胞を単離し、培養により I 型様細胞へと転換させることで、I 型細胞の特性に着目した検討、II 型細胞の特性に着目した検討の両者を遂行することが可能となる。まず、ラット正常肺胞上皮細胞の形態観察、分化の確認を行った。単離操作により得られた細胞についての特性評価の結果、90%以上が生細胞であること、得られた細胞のほぼ全てが II 型肺胞上皮細胞とであることが明らかになった。次に、単離した正常 II 型細胞が培養により I 型様細胞へと分化するか否か検討を行った。高密度の細胞播種では II 型細胞の特性が保持される傾向にあるが、低密度での細胞播種時には I 型様細胞への分化が促進されることが報告されているため、本検討においても細胞播種時に細胞密度に差をつけた。培養 2 日目では II 型細胞の特性であるラメラ体が数多く観察された。一方、6 日目では I 型細胞への分化の指標である扁平化が起り、ラメラ体は減少していることが確認された。さらに、I 型、II 型様細胞のマーカー分子の発現変動についての検討を行った。培養 6、8 日目では I 型様細胞のマーカー分子である caveolin-1 の mRNA 発現量は増加した一方で、II 型細胞のマーカー分子である GABRP、Sftpb および Sftpal の mRNA 発現量は減少した。前述の通り、筆者らはヒト由来の肺胞上皮細胞 A549 における AMD/DEA 肺蓄積メカニズムには OATP2B1 が関与していることを報告している。構築したラット正常肺胞上皮細胞を用いた薬物動態学的検討により、生体内環境における AMD、DEA の肺蓄積にも Oatp ファミリーが関与していることを明らかにした。これらの知見は、トランスポータを介した AMD ならびに DEA の輸送の制御が AMD 誘発性肺障害の予防法構築にあたって有用な標的となる可能性を示唆するものであった。

ラット正常肺胞上皮細胞系ならびに A549 において AMD/DEA の輸送に影響を与えた化合物が、それらの肺障害作用に与える影響について検討した結果、スルフォプロモフタレイン (BSP)、エストロン-3-硫酸 (E-3-S)、デヒドロエピアンドロステロン硫酸 (DHEAS) の 3 種の化合物は、A549 に対する AMD/DEA の障害効果を抑制した。さらに、BSP はラット正常肺胞上皮細胞に対する AMD/DEA の障害効果を抑制した。また、A549 において、E-3-S の取り込みが AMD 共存により著しく促進されることを見出した。同様の現象は薬物経口投与後の吸収過程の評価モデルとして繁用されている Caco-2 細胞においても確認された。この現象は、AMD が OATP2B1 の基質となる毒性物質の消化管吸収ならびにそれに続く肺

胞移行を促進し、AMD 誘発性肺障害をもたらすという可能性を示唆するものであった。

AMD による OATP2B1 を介した取り込み促進機構について検討を行った結果、Caco-2 細胞において、AMD が 3 種の OATP2B1 典型基質、スルフォプロモフタレイン (BSP)、デヒドロエピアンドロステロン硫酸 (DHEAS)、タウロコール酸 (TC) の取り込みを促進すること、その取り込み促進現象は、共存 5 分という短時間でも確認されること、 Na^+ free ならびに Cl^- free の条件下で減弱することが明らかとなった。AMD による E-3-S の取り込み促進に対する種々 OATP2B1 基質の共存効果を評価したところ、BSP ならびに E-3-S は AMD による E-3-S の取り込み促進現象をほぼ完全に消失させたが、DHEAS やプラバスタチン、ベンジルペニシリンがこの取り込み促進現象に対して与える影響は大きくなく、OATP2B1 基質となる化合物でも、その構造により OATP2B1 を介した取り込み促進現象に与える影響は異なることが示唆された。また、取り込み促進現象に対する速度論的解析の結果、取り込み促進は V_{max} の増大すなわち、輸送活性の増大に起因するものであることが明らかとなった。そこで、OATP2B1 の蛋白発現量について検討を行ったところ、AMD 処置 5 分で OATP2B1 蛋白発現量が急速に増大し、その後緩やかに減少し、処置後 240 分の時点で発現量が非処置時と同程度まで減少することが明らかとなった。今後、OATP2B1 発現誘導の分子機構を明らかにし、薬剤性肺障害を予防する標的分子としての可能性を検討していきたいと考えている。

OATP2B1 を標的とした検討と並行して食品機能成分の肺蓄積性に関する検討を行い、ほうれん草、卵黄などに豊富に含有される食品機能成分ルテインが高い肺蓄積性を有することを見出した。しかしながら、輸送実験の結果、ルテインの肺蓄積には OATP2B1 は関与していないと考えられた。一方、ルテインのトランスポータ阻害作用に関する実験の過程において、ルテインがコレステロールの吸収抑制効果を有する可能性が判明した。検討の結果、ルテインは消化管に存在するコレステロール輸送系 NPC1L1 を阻害することを見出した。

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 4 件)

1. Sato, Y., Suzuki, R., Kobayashi, M., Itagaki, S., Hirano, T., Noda, T., Mizuno, S., Sugawara, M. and Iseki, K. Involvement of cholesterol membrane transporter Niemann-Pick C1-Like 1 in

- the intestinal absorption of lutein. **J. Pharm. Pharmaceut. Sci.** 15: 256-264 (2012) 査読あり
2. 板垣 史郎, 有機アニオントランスポーター OATP2B1 の臨床的有用性. **医薬品相互作用研究** 35: 1-10 (2011) 査読あり
 3. 板垣 史郎, 日本人に高頻度に発現する薬剤性肺障害の予防に関する研究. **薬学研究の進歩** 27: 67-72 (2011) 査読なし
 4. 板垣 史郎, ルテインの化学的特性を利用した薬剤性肺障害予防法の確立. **財団法人 旗影会 平成 21 年度研究報告概要集** 28 (2010) 査読なし

[学会発表] (計 5 件)

1. 板垣 史郎 「消化管吸収過程における医薬品と食品機能成分との相互作用」、第 11 回青森県臨床薬学研究会、弘前、2010 年 7 月
2. 関 悟, 板垣 史郎, 小林 正紀, 山口 浩明, 井関 健 「抗不整脈薬アミオダロンおよび DEA の肺細胞への取り込み機構と細胞障害性との関連」日本薬学会北海道支部第 134 回例会 (2010 年 5 月、札幌)
3. 板垣 史郎 「北海道産食品素材を利用した疾病予防の試み」、第 4 回 Bio-S ライフサイエンス・フォーラム・北海道バイオ産業クラスターフォーラムシーズ公開会、札幌、2009 年 12 月
4. Yuki Sato, Masaki Kobayashi, Shirou Itagaki, Toshihiro Noda, Satoshi Mizuno, Ken Iseki “Intestinal absorption of lutein and some approaches for improvement of the absorption” 2009 AAPS Annual Meeting and Exposition (2009, November, Los Angeles, CA)
5. 瀬川雅博、小林正紀、板垣 史郎、井関 健 「アミオダロンによる薬物取り込み促進機構の解明」第 23 回北海道薬物作用談話会 (2009 年 7 月、札幌)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

板垣 史郎 (ITAGAKI SHIRO)

弘前大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：00360925