

学 位 論 文 題 名

抗不整脈薬アミオダロンおよび

その活性代謝物の肺上皮細胞輸送機構と肺障害性への関与

学位論文内容の要旨

抗不整脈薬アミオダロン (AMD) は、他剤無効性の難治性、致死性不整脈に対して使用される。AMD は高い肺移行性を示し、間質性肺炎や肺繊維症などの重篤な肺障害を引き起こすことが知られている。また、AMD の活性代謝物である N-モノデスエチルアミオダロン (DEA) も AMD と同様に高い肺移行性と肺障害性を有しており、これら化合物の特性は AMD の临床上での使用を困難にしている。これまで、両化合物の肺障害性に関してはこれらの直接的な肺細胞障害メカニズムに焦点が当てられ、ミトコンドリアの機能異常など様々な説が提唱され盛んに研究が行われている。しかしながら、両化合物の選択的な肺移行性もまた肺障害性の大きな要因の一つであると考えられる。これまで両化合物は P-glycoprotein や rat organic anion transporting polypeptide (Oatp) 2 などのトランスポーターに対して阻害効果を示すことが報告されているものの、これら化合物自体の体内動態に直接関わる輸送機構については未だ不明な点が多いのが現状である。そこで本研究では、肺胞上皮における AMD および DEA の輸送機構について検討し、さらに肺障害性との関連性について考察した。

1) In vitro 肺胞上皮モデルにおける AMD、DEA の輸送機構

両化合物の肺移行性を評価するには、肺胞上皮を模した Transwell 上での肺胞上皮細胞の単層膜系が有用なモデルとなる。正常肺組織より単離した II 型肺胞上皮細胞は分化、増殖により I 型肺胞上皮細胞に近い性質を有し、培養細胞に比較し細胞間に強固な tight junction を形成した単層膜を構築できることが報告されている。そこで、SD ラット肺より II 型細胞を単離し、in vitro 肺胞上皮モデルの構築を試みた。その結果、単離した II 型細胞は 6 日間の培養により扁平状の I 型様細胞へ分化することが確認された。また、この形態変化に伴い I 型細胞のマーカーである caveolin-1 の mRNA 発現量は増加し、II 型細胞のマーカーである Gabrp、Sftpa 1、Sftpb の発現量は減少した。さらに、培養細胞と比較して高い膜抵抗値が確認され、mannitol 透過性試験においても非常に低値の透過係数 (P_{app}) を示すことが明らかとなった。以上の結果より、本評価系は肺胞上皮における薬物輸送評価モデルのひとつとして有用であると考えられた。

作製した in vitro 肺胞上皮モデルを用いて AMD および DEA の透過性試験を行った。その結果、両化合物の P_{app} は apical to basolateral (a to b) と比較して basolateral to apical (b to a) の方が高い値を示した。したがって、両化合物の b to a 方向、すなわち血管側から肺胞上皮側への輸送に何らかの機構が関与している可能性が考えられた。そこで、両化合物の basolateral 側から単層膜への輸送について阻害実験を行ったところ、Organic cation transporter (Oct) の基質である TEA、choline は阻害効果を示さなかった。これに対し、AMD、DEA の取り込みは種々のアニオン性化合物 (BSP、E-3-S、DHEAS) により強く阻害された。これらの化合物は

Organic anion transporter (Oat) および Oatp のいずれの基質にもなりうるが、Oat の代表的な基質である PAH は両者の取り込みを阻害しなかったことから、アニオン性化合物輸送系の中でも Oatp が AMD、DEA の輸送に関与している可能性が高いことが考えられた。

2) A549 細胞を用いた輸送機構の解析

In vitro 肺胞上皮モデルにおいて明らかとなった AMD、DEA の輸送機構について、ヒト肺胞上皮細胞のモデルである A549 細胞を用いてさらに詳細な解析を行った。

AMD、DEA の A549 細胞への取り込みは濃度飽和性および温度依存性を示したことから、両者の取り込みには何らかの輸送担体が関与していることが示唆された。In vitro 肺胞上皮モデルでの結果を支持するように、両者の取り込みは BSP、E-3-S および DHEAS により阻害されることが明らかとなった。一方、OCT の基質である TEA、choline の阻害効果は認められなかった。さらに、PAH は AMD、DEA の取り込みを阻害しなかったことから、A549 細胞における両者の輸送にも OATP が関与している可能性が考えられた。一方、多くの OATP サブタイプの特異的基質である甲状腺ホルモン T_3 による阻害効果はほとんど認められなかった。OATP ファミリーのうち T_3 を認識しないと報告されているサブタイプは、現在のところ OATP2B1 のみである。そこで、他の OATP2B1 の基質 (benzylpenicillin、pravastatin) および阻害剤 (taurocholic acid、DIDS、indomethacin、valproic acid) が AMD、DEA 取り込みに及ぼす影響を検討したところ、いずれの化合物も取り込みを有意に減少させた。さらに、siRNA を用いて OATP2B1 をノックダウンすることにより両者の取り込みは有意に減少した。以上の結果より、AMD、DEA の輸送に OATP2B1 が関与していることが明らかとなった。

3) AMD、DEA の細胞障害性に対する輸送機構の関与

最後に、AMD および DEA の輸送機構が両者の障害性に及ぼす影響について検討した。AMD 24 時間接触により A549 細胞の生存率は AMD 濃度依存的に減少し、50%増殖抑制濃度 (IC_{50} 値) は $50.1 \pm 4.5 \mu M$ と算出された。しかしながら、AMD 輸送を阻害した BSP (0.25 mM) を共存させることにより IC_{50} 値は $65.6 \pm 3.7 \mu M$ に上昇した。さらに、AMD による A549 細胞形態の球状化は BSP により抑制されることが明らかとなった。DEA (6 時間接触) についても、BSP により IC_{50} 値は $14.0 \pm 1.3 \mu M$ から $45.2 \pm 11.1 \mu M$ に上昇し、細胞形態の球状化が抑制されることが明らかとなった。また、BSP と同様に AMD、DEA の輸送を阻害した E-3-S と DHEAS についても、このような細胞障害性に対する抑制効果が確認された。一方、取り込み阻害効果を示さなかった化合物である TEA、choline、PAH ならびに T_3 は、AMD、DEA による細胞障害性に対して全く影響を与えなかった。さらに、AMD、DEA の in vitro 肺胞上皮モデルに対する障害性は、BSP を共存させることにより抑制されることが明らかとなった。以上の結果から、肺胞上皮における AMD および DEA の輸送制御により、肺障害性が軽減できる可能性が示された。

以上、本研究により明らかになった AMD および DEA の輸送機構は、肺組織への両化合物の蓄積メカニズムの解明の一助となり、また AMD 投与時の肺障害発症リスクの回避法の確立につながることを期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 井 関 健

副 査 教 授 菅 原 満

副 査 准教授 武 隈 洋

副 査 准教授 山 口 浩 明

学 位 論 文 題 名

抗不整脈薬アミオダロンおよび

その活性代謝物の肺上皮細胞輸送機構と肺障害性への関与

アミオダロン (AMD) は、他剤無効性の難治性、致死性不整脈に対しても強力な抗不整脈作用を発揮し、しばしば「Last Choice」としての治療薬に位置づけられる。しかしながら、その重篤な副作用として間質性肺炎や肺繊維症などの肺障害が報告されており、高用量投与患者では 5-10%の確率で引き起こされる。AMD の活性代謝物である N-モノデスエチルアミオダロン (DEA) についても肺障害性が報告されており、そのような肺障害発症のリスクは AMD の臨床上的での使用を困難にしている。AMD、DEA による細胞障害メカニズムについては、ミトコンドリアの機能異常、フリーラジカルの産生など様々な説が提唱されている。一方、AMD および DEA は高い肺組織蓄積性をもつことが知られており、このことも肺障害の重要な要因となると考えられる。これまで両化合物は P-glycoprotein や rat organic anion transporting polypeptide (Oatp) 2 に対して阻害効果を示すことが報告されているものの、これら化合物自体の体内動態に直接関わる輸送機構については未だ不明な点が多いのが現状である。本論文では、未だ明らかとされていない肺胞上皮における AMD および DEA の蓄積メカニズムについて解析し、さらに肺障害性との関連性について体内動態額的な側面から検討した。

1) In vitro 肺胞上皮モデルを用いた輸送機構の検討

肺胞上皮はガス交換に関与する I 型肺胞上皮細胞と、I 型細胞の前駆細胞であり、肺サーファクタント分泌能などの多彩な機能を持つ II 型肺胞上皮細胞から構成されている。正常肺組織より単離した II 型細胞は分化、増殖により I 型細胞に近い性質を有し、A549 細胞などの培養細胞と比較して細胞間に強固な tight junction を形成した単層膜を構築できることが報告されている。そこで、SD ラット肺より II 型細胞を単離し、これを用いて in vitro 肺胞上皮モデルの構築を試みた。単離した細胞は、変法 Papanicolaou 染色により、ほぼ全てが紫色に染まる細胞内顆粒を持つ II 型細胞であることが確認された。また、6 日間の培養により扁平状の I 型様細胞へ分化することが明らかとなった。さらに、A549 細胞と比較して単離した肺胞上皮細胞で構築した単層膜では高い膜抵抗値が確認され、mannitol 透過性試験においても非常に低値の透過係数を示すことが明らかとなった。以上の結果より、本評価系は従来の培養細胞では成し得ない、生体内環境をよりの確に反映した肺胞上皮における薬物輸送評価モデルのひとつとして有用であると考えられる。

作製した *in vitro* 肺胞上皮モデルを用いて AMD および DEA 透過性試験を行った。その結果、両化合物の透過係数は apical to basolateral と比較して basolateral to apical の方が有意に高い値を示すことが明らかとなった。このことは、両化合物の肺毛細血管側から肺胞気腔側への輸送、すなわち肺蓄積メカニズムに何らかの機構が関与している可能性があることを示している。そこで、両化合物の basolateral 側から、単層膜への輸送について各種阻害剤を用いて検討を行ったところ、AMD、DEA の取り込みは BSP、E-3-S、DHEAS によって阻害され、両者の輸送機構に Oatp が関与している可能性を見出した。

2) A549 細胞における AMD、DEA の輸送メカニズム

In vitro 肺胞上皮モデルを用いた検討において明らかとなった AMD、DEA の輸送機構と OATP との関連について、ヒト肺胞上皮細胞のモデルである A549 細胞を用いてさらに詳細な解析を行った。その結果、*In vitro* 肺胞上皮モデルでの検討と同様に AMD、DEA の取り込みは BSP、E-3-S、DHEAS によって阻害されることが明らかとなった。また、甲状腺ホルモン T_3 は AMD、DEA の取り込みに対して阻害効果を示さなかったことから、両化合物の取り込みに T_3 を認識しない OATP サブタイプである OATP2B1 が関与している可能性が考えられた。そこで、他の OATP2B1 の基質および阻害剤が AMD、DEA 取り込みに及ぼす影響を検討したところ、いずれの化合物も取り込みを有意に減少させた。さらに、siRNA を用いて OATP2B1 をノックダウンすることにより両化合物の取り込みは有意に減少した。以上の結果より、AMD、DEA の輸送に OATP2B1 が関与していることが明らかとなった。

3) AMD、DEA の輸送機構と細胞障害性との関連

1)、2)の検討により明らかとなった AMD、DEA の輸送機構が両化合物の細胞障害性に与える影響について検討した。AMD、DEA の輸送機構に対して取り込み阻害効果が認められなかった TEA、choline、PAH ならびに T_3 は両化合物の A549 細胞に対する障害性に対して軽減効果を示さなかった。一方、AMD、DEA の取り込みを顕著に阻害した BSP、E-3-S、DHEAS は両化合物の細胞障害性を有意に抑制した。さらに、A549 細胞において確認された BSP による AMD、DEA の障害性に対する軽減効果は、*in vitro* 肺胞上皮モデルにおいても観察された。以上の結果より、AMD、DEA の輸送機構は両化合物の障害性発現に関与しており、両化合物の輸送制御により肺胞上皮の障害性を軽減できる可能性が示された。

以上、本研究は *in vitro* レベルで AMD、DEA の肺移行性メカニズムを詳細に解析し、さらに両化合物の輸送機構が肺障害性に寄与していることを明らかにした。AMD、DEA による薬剤性間質性肺炎は不可逆的な肺の繊維化を生じ、根本的な治療法が確立されていないのが現状である。本研究は、AMD、DEA の輸送制御により肺障害発症のリスクを低減した安全な AMD 使用法につながることを期待される。以上の点で、本論文『抗不整脈薬アミオダロンおよびその活性代謝物の肺上皮細胞輸送機構と肺障害性への関与』の研究成果は新規性に富み、博士 (生命科学) の学位を受けるに十分値するものと認めた。