

新規人工調製肺サーファクタントの研究と高機能性特化への応用展開

中原 広道

A Study on Novel Artificial Lung Surfactants Incorporated with Partially Fluorinated Amphiphiles

Hiromichi Nakahara

Department of Biophysical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki International University; 2825-7 Huis Ten Bosch, Sasebo, Nagasaki 859-3298, Japan.

(Received March 27, 2012)

Lung surfactants (LS), a complex of ~90 wt% lipids (mainly dipalmitoylphosphatidylcholine or DPPC) and ~10 wt% surfactant proteins (SP-A, -B, -C, and -D), adsorb to an air-alveolar fluid interface and then lower its surface tension down to near zero during expiration. Intratracheal instillation of exogenous LS preparations can effectively compensate for surfactant deficiency in premature infants with respiratory distress syndrome (RDS). Surfacten® (Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation, Osaka, Japan), a modified bovine lung extract and an effective surfactant replacement in treatment for RDS patients, is supplemented with DPPC, palmitic acid, and tripalmitin. For the premature infants suffering from RDS, instillation of Surfacten® leads to a dramatic improvement in lung function and compliance. Herein, the author reviews potential use of newly designed preparations containing a mimicking peptide of SP-B and also introduces the current research on the preparations incorporated with partially fluorinated amphiphiles to improve their efficacy.

Key words—lung surfactant; phospholipid; surfactant protein B; respiratory distress syndrome; monolayer; surfacten

1. はじめに

哺乳類の肺胞表面を覆っている界面活性物質は、肺サーファクタント (LS, 脂質-タンパク質複合体) と呼ばれ、呼吸運動や自然免疫防御作用等、生命を維持する上で非常に重要な役割を担っている。その中で最も重要な性質として、肺胞内表面における表面張力低下作用が挙げられる。これにより呼吸時における肺胞拡張の負担を軽減し、肺胞の虚脱を防ぐことができる。¹⁾ また LS には、外来性ウイルスや細菌に対する免疫作用も知られている。LS は肺胞 II 型細胞で合成され、細胞質にラメラ体として貯蔵される。肺胞腔に分泌されると LS はその形状を管状ミエリン構造に変え、急速に肺胞表面に吸着される。²⁻⁵⁾ 肺胞表面では、疎水部を肺胞腔、親水部を上皮細胞側に配列した単分子膜を形成し呼吸に伴

う肺胞表面積の増減に伴って表面活性作用を発揮する。

LS は、脂質 (~90 wt%) とタンパク質 (~10 wt%) からなる複合体である。その構成脂質は主にホスファチジルコリンであり、その約 50 wt% はジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) を含有している。また少量ではあるが、非常に重要な構成脂質として、ホスファチジルグリセロール (PG) やパルミチン酸 (PA) 等を含んでいる。⁶⁻⁹⁾ DPPC は肺組織以外の細胞膜構成脂質にはほとんど含有されていないが、LS では主成分であり、非常に重要な役割を担っている。^{10,11)} DPPC は肺胞表面積の減少に伴い、密に詰まった膜を形成し、肺胞表面の表面張力をほぼ 0 mN/m にまで引き下げる。この際、流動性の高い成分は肺胞表面から排出され、表面はほぼ DPPC で覆われている。しかしながら、このように密に圧縮された膜は、肺胞の拡張時には再展開し難く、肺胞の虚脱を招いてしまう。¹²⁾ この欠点を補うのが微量成分である陰イオン性脂質 (特に PG) とタンパク質 (陽イオン性) で

The author declares no conflict of interest.

長崎国際大学薬学部薬学科 (〒859-3298 長崎県佐世保市ハウステンボス町 2825-7)

e-mail: nakahara@niu.ac.jp

本総説は、平成 23 年度日本薬学会九州支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

ある。陰イオン性脂質とタンパク質はその反対荷電により表面近傍で特異的な分子集合体を形成し、協同的に、あるいは単独で DPPC の表面吸着及び再展開を助長すると考えられている。¹³⁻¹⁵⁾ また PA は、天然あるいは人工の LS に対する添加物として頻用されており、およそ 10 wt% 程添加すると薬効を飛躍的に増大させる。^{16,17)} PA の役割としては、DPPC 膜の剛直さの増強が言われていたが、¹⁷⁻¹⁹⁾ 最近ではその作用に加えタンパク質との分子集合体形成にも関与していることが報告されている。²⁰⁾

LS に含まれているタンパク質には 4 種のサブタイプ (SP-A, SP-B, SP-C, SP-D) が存在する。SP-A と SP-D は親水性タンパク質であり、呼吸により吸入された病原体に対する一次免疫応答に深く関係しており、²¹⁾ また LS の貯蔵や輸送に関しても重要な役割を担っている。^{22,23)} 一方、SP-B と SP-C は疎水性タンパク質であり、主に肺胞表面における表面活性作用を司っている。特に SP-B と SP-C は LS の急速な表面吸着に関与しており、肺胞表面積の圧縮・拡張時の可逆的な脂質分子輸送に重要な役割を示す。²⁴⁻²⁶⁾

2. 肺サーファクタントの欠乏

LS が欠乏すると新生児呼吸窮迫症候群 (NRDS) や急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) を発症する。現在、日本では健康な牛肺由来抽出物を成分調製した Surfacten[®] (田辺三菱製薬株式会社) が NRDS に対する治療薬として使用されている。しかしながら、動物由来型 LS は牛海綿状脳症 (BSE) の発症以来、アレルギーを引き起こす可能性、その他の動物感染症の問題からその使用が懸念されている。実際に BSE 問題により、Surfacten[®] の原料が国内産からニュージーランド産及びオーストラリア産に変更された経緯がある。このような動物由来物を原料とする医薬品は、ロット間 (バッチ間) の組成不均一性及び抽出・精製過程に莫大な労力を伴うことが問題視されている。このため Surfacten[®] は、約 11 万円/120 mg/vial と非常に高価であり、また NRDS 以外は保険診療適用外の現状である。近年は動物由来型 LS の代替医薬品として、合成脂質やタンパク質 (ペプチドアナログ) 等で調製した人工型 LS (Table 1) の研究が盛んに行われている。²⁷⁻²⁹⁾ 一方で ARDS は、敗血症や肺炎等により直接的あるいは間接的に肺が障害を受け、その結果血液等の液体

Table 1. Typical Lung Surfactant Preparations in Current Use Worldwide

	Surfactant	Country	Content
Endogenous preparation	Surfacten	Japan	bovine lung extracts
	Alveofact	Italy	bovine lung extracts
	Survanta	USA	bovine lung extracts
	Curosurf	Germany	porcine lung extracts
	Infasurf	USA	porcine lung extracts
Artificial preparation	Exosurf	USA	DPPC, HD, tyloxapol
	ALEC	UK	DPPC, PG
	Surfaxin*	USA	DPPC, POPG, PA, KL ₄
	Venticute**	Germany	DPPC, POPG, PA, rSP-C

HD: 1-hexadecanol, POPG: 1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylglycerol.
* approved for NRDS treatment (6 March, 2012). ** not approved.

成分 (血漿や血清) が肺胞内部に漏出することにより引き起こされる。肺胞内部の表面に血漿タンパク質等が侵食すると、LS の機能が失われ、急性の呼吸困難となってしまう。また、ARDS を罹患すると、様々な合併症を引き起こすことが知られており、治療が困難となってしまう。現在は、高濃度の酸素ガスによる機械的人工換気下において慎重に薬物治療が行われているが、人工換気による二次的な肺損傷 (高い圧力による物理的な損傷や高い FiO₂ (吸気酸素濃度) による酸素障害) が問題となっている。ARDS に対して LS 補充療法を行う際には、1 回投与量が NRDS の 20-30 倍必要となり非常に高コストであるため、現状では実施されていない。ARDS による LS 不活性化及び再活性化については現在分子レベルでの解析が進んでいる。³⁰⁻³⁷⁾

3. SP-B タンパク質アナログ

われわれはこれまでに一連の疎水性・親水性バランス (HHB) 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 (Bulk 物性) について研究を行ってきた。³⁸⁻⁴¹⁾ これらすべてのペプチドは α -ヘリック



中原広道

長崎国際大学薬学部講師。2003 年九州大学薬学部卒業。2005 年同大学院薬学府修士課程修了。2006 年日本学術振興会特別研究員 (DC2)。National Cheng Kung University 委託研究員。2008 年九州大学大学院薬学府博士後期課程修了 (Ph.D.)。2012 年 4 月より現職。2007 年日本油化学会ヤングフェロー賞、2011 年日本薬学会九州支部学術奨励賞、2012 年長崎県科学技術奨励賞受賞。

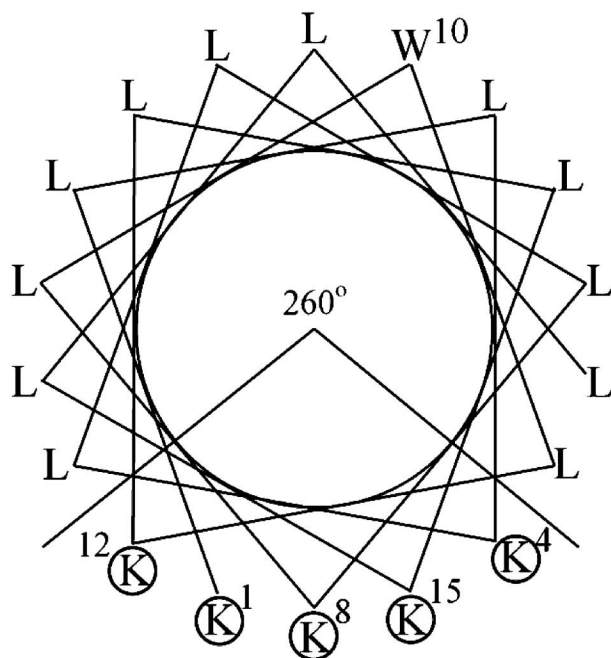


Fig. 1. Helical Wheel Representation of Hel 13-5

The abbreviations with and without open circles denote hydrophilic and hydrophobic amino acids, respectively.

ス構造を形成するとき、両親媒性構造を司るようにデザインされている。そのうちで最も疎水性の強い Hel 13-5 (Fig. 1) が生体リン脂質とナノチューブ状の構造をとることが明らかとなった。この挙動は肺表面における脂質の拡散に重要な役割を果たしている管状ミエリン構造を彷彿させた。また Hel 13-5 は、LS タンパク質の中で表面介在性である SP-B タンパク質 (4つの α -ヘリックス部位を持つ) の1つの α -ヘリックス構造の模倣ペプチドでもある。そこでわれわれは Hel 13-5 を主体とした安全で、安価で、有効な新規人工調製肺サーファクタントの開発に取り組んでいる。

4. 人工調製型肺サーファクタント

われわれは、LS の脂質成分として DPPC/PG/PA (=68:22:9, wt/wt/wt) を用いている。これは、羊水中の脂質組成と同じであり、最も有効な LS 脂質混合物として多くの研究者によって使用され、また実際に RDS 治療薬にも適用されている (Table 1)。本研究を進めるに当たり、まず、各構成成分の LS 調製物中でのそれぞれの役割を検討した。DPPC は実際の LS の主成分であり、肺胞気/液界面の表面活性作用発現に必須である。しかしながらこの DPPC は表面吸着能また展開能が非常に

乏しく、そのみでは表面活性能を発揮できない。そこで最も単純な系 (DPPC/Hel 13-5) において、表面吸着能を検討した。その結果、DPPC のみでは表面にほとんど吸着されなかったが、少量の Hel 13-5 を添加により急速に吸着し、表面張力を 34 mN/m 減少させた。この結果は SP-B や SP-C の挙動と同様であることから、Hel 13-5 は肺サーファクタント代替ペプチドとしての可能性を保持していることが見いだされた。⁴²⁾ また PG は、アニオンであることから Hel 13-5 (カチオン) と選択的に相互作用し、膜の圧縮に伴って Hel 13-5 の脱着現象を促進し、その後安定な二分子膜様構造をとる。⁴³⁾ 一方、PA は DPPC 膜の耐崩壊性作用を増強すると同時に、Hel 13-5 の脱着現象を助長することが明確となっている。^{17-20,43)} これら個々の構成成分の役割を踏まえ、次に *in vitro* で新規人工調製 LS (DPPC/PG/PA/Hel 13-5) と RDS 治療薬 (Surfacten[®]) との物性比較を行った。種々の表面物性解析法 (表面圧 (π)—分子占有面積 (A) 等温線, 表面電位 (ΔV)— A 等温線, 顕微鏡画像) で比較検討した結果、表面物性の点においてこの調製物は Surfacten[®] に匹敵する結果が得られた (Fig. 2)。⁴⁴⁾ さらに *in vivo* で両調製物を比較検討した結果、肺コンプライアンスの点においてもこの調製物は Surfacten[®] に匹敵することが見いだされた。⁴⁵⁾

5. 高機能性特化に向けて

フッ素置換された化合物 (部分フッ素化合物) は、優れた表面活性能及び撥水撥油性を示すため、産業及び医療の分野で多用されている。特に医療の分野においては、手術時の代替血液媒体 (perfluorooctylbromide; PFOB) として応用が期待されている。一方で、部分フッ素化合物は体内あるいは環境への蓄積性が問題視されているが、分子全体に占めるフッ素化の割合が小さいと生体内でも短期間で代謝されると考えられている。また部分フッ素化合物は、その短所を超越した特異的な性質を保持している。例えば、低い表面張力、屈折率 (分極率)、比誘電率を示す一方で、密度、圧縮率、粘度、臨界温度に関しては、高い値を示す。これらの特異性は、強い分子内結合と弱い分子間相互作用に反映されている。LS は、圧力・温度に対して「剛直さ」と「柔軟さ」といった相反する複雑な性質を示すが、現在までに部分フッ素化合物の添加により LS の効果を増強す

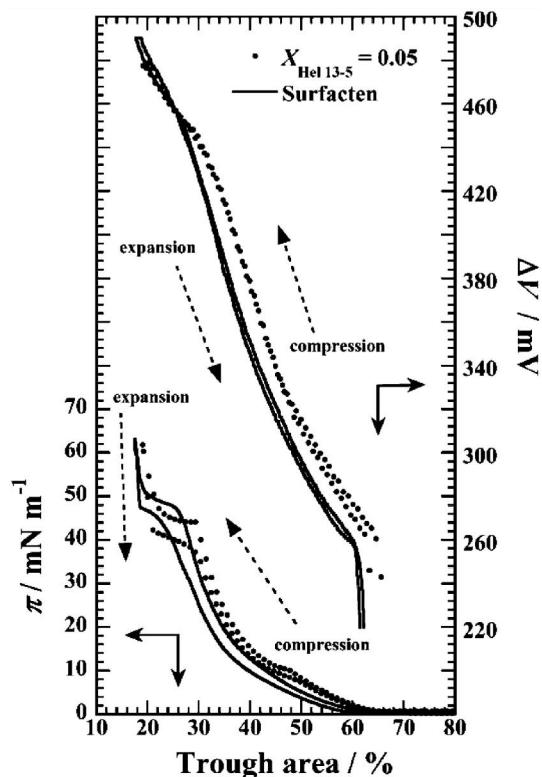


Fig. 2. Cyclic Compression and Expansion Isotherms (or Hysteresis Curves) of the DPPC/PG/PA/Hel 13-5 Preparation at $X_{\text{Hel 13-5}}=0.05$ and Surfacten at the 1st Cycle⁴⁴⁾

ることを裏付けている。⁴⁶⁾ 特に人工型 LS に組み込むことによって長期保存が可能となり、BSE の再発や天災等の予期せぬ非常事態の際にも安定した供給が期待できる。

6. おわりに

1987 年に岩手医大名誉教授 藤原哲郎先生らが世界で初めて NRDS 治療薬 (Surfacten[®]) を開発して以来、LS に関する分子レベルでの研究報告が国際的に活発になされている。動物肺由来型 LS は薬効が優れているが、本総説で述べた諸問題が危惧されている。一方で完全合成型 LS は、1) 脂質混合物 (Exosurf, Pumactant) と 2) 脂質-タンパク質 (あるいは模倣ペプチド) 混合物に関して研究が進められている。1) の調製物は、効能が動物由来型と比べて極端に低く、また価格も動物肺由来型とほぼ同等であるため、現在ではほとんど使用されていない。一方で、タンパク質アナログを含有する 2) の調製物は動物肺由来型と同様の効能が期待されているため世界的に開発研究が加速している。現在までに、組換えタンパク質 (rSP-C) を含有した Venti-

cute と、アミノ酸 21 残基からなる人工合成ペプチド KL₄ を含有した Surfactin が知られている。しかしながら、Venticute に関しては、組換えタンパク質の高次構造が天然のものと相違しているため、効能が低いと言われている。一方で Surfactin は高次構造の影響を受け難いペプチド断片を含んでおり、牛肺由来の LS と同等の生存率を示したとの報告も存在している。われわれの人工調製型 LS はアミノ酸 18 残基のペプチドを含有しているため、Surfactin より低コスト化が期待できる。また現段階で Surfacten[®] に匹敵する効能を保持していることから今後、飛躍的な効能の改善、及び超低コスト化を実現できれば、呼吸器疾患全般 (喘息等) への適用拡大が大いに期待できる。

謝辞 本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金 (特別研究員奨励費: No. 18.9587, 若手研究スタートアップ: No. 20810041, 若手研究 B: No. 22710106), 財団法人武田科学振興財団 (薬学系研究奨励) の御支援を賜りました。また、本総説で紹介した研究内容は、長崎国際大学柴田 攻教授及び福岡大学李 相男先生の御指導の下に行われました。さらに、研究遂行においては、多くの研究者の方々にご助力頂きました。ここに深く御礼申し上げます。

REFERENCES

- 1) Schürch S., Goerke J., Clements J. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 4698-4702 (1976).
- 2) Bastacky J., Lee C. Y., Goerke J., Koushafar H., Yager D., Speed T. P., Chen Y., Clements J. A., *J. Appl. Physiol.*, **79**, 1615-1628 (1995).
- 3) Putman E., Creuwels L. A., van Golde L. M., Haagsman H. P., *Biochem. J.*, **320**, 599-605 (1996).
- 4) Notter R. H., Penney D. P., Finkelstein J. N., Shapiro D. L., *Pediatr. Res.*, **20**, 97-101 (1986).
- 5) Magoon M. W., Wright J. R., Baritussio A., Williams M. C., Goerke J., Benson B. J., Hamilton R. L., Clements J. A., *Biochim. Biophys. Acta*, **750**, 18-31 (1983).
- 6) Yu S.-H., Possmayer F., *J. Lipid Res.*, **44**, 621-629 (2003).

- 7) Krüger P., Baatz J. E., Dluhy R. A., Lösche M., *Biophys. Chem.*, **99**, 209–228 (2002).
- 8) Postle A. D., Heeley E. L., Wilton D. C., *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, **129**, 65–73 (2001).
- 9) Veldhuizen R., Nag K., Orgeig S., Possmayer F., *Biochim. Biophys. Acta*, **1408**, 90–108 (1998).
- 10) Brown E. S., *Am. J. Physiol.*, **207**, 402–406 (1964).
- 11) Brown E. S., *Fed. Proc.*, **21**, 438 (1962).
- 12) Fleming B., Keough K. M. W., *Chem. Phys. Lipids*, **49**, 81–86 (1988).
- 13) Chang R., Nir S., Poulain F. R., *Biochim. Biophys. Acta*, **1371**, 254–264 (1998).
- 14) Johansson J., Curstedt T., Jörnvall H., *Biochemistry*, **30**, 6917–6921 (1991).
- 15) Baatz J. E., Elledge B., Whitsett J. A., *Biochemistry*, **29**, 6714–6720 (1990).
- 16) Gorree G., Egberts J., Bakker G., Beintema A., Top M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1086**, 209–216 (1991).
- 17) Cockshutt A. M., Absolom D. R., Possmayer F., *Biochim. Biophys. Acta*, **1085**, 248–256 (1991).
- 18) Tanaka Y., Takei T., Aiba T., Masuda K., Kiuchi A., Fujiwara T., *J. Lipid Res.*, **27**, 475–485 (1986).
- 19) Lee K. Y. C., Gopal A., von Nahmen A., Zasadzinski J. A., Majewski J., Smith G. S., Howes P. B., Kjaer K., *J. Chem. Phys.*, **116**, 774–783 (2002).
- 20) Nakahara H., Lee S., Shoyama Y., Shibata O., *Soft Matter*, **7**, 11351–11359 (2012).
- 21) Miyamura K., Leigh L. E., Lu J., Hopkin J., Lopez Bernal A., Reid K. B., *Biochem. J.*, **300**, 237–242 (1994).
- 22) Voorhout W. F., Veenendaal T., Haagsman H. P., Verkleij A. J., van Golde L. M. G., Geuze H. J., *J. Histochem. Cytochem.*, **39**, 1331–1336 (1991).
- 23) Goerke J., *Biochim. Biophys. Acta*, **344**, 241–261 (1974).
- 24) Taneva S., Keough K. M., *Biophys. J.*, **66**, 1137–1148 (1994).
- 25) Taneva S., Keough K. M., *Biophys. J.*, **66**, 1149–1157 (1994).
- 26) Taneva S., Keough K. M., *Biophys. J.*, **66**, 1158–1166 (1994).
- 27) Ma J., Koppenol S., Yu H., Zografi G., *Biophys. J.*, **74**, 1899–1907 (1998).
- 28) Spragg R. G., Lewis J. F., Wurst W., Hafner D., Baughman R. P., Wewers M. D., Marsh J. J., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **167**, 1562–1566 (2003).
- 29) Nakahara H., Lee S., Shibata O., *Biophys. J.*, **96**, 1415–1429 (2009).
- 30) Calkovska A., Some M., Linderholm B., Johansson J., Curstedt T., Robertson B., *Biol. Neonate*, **88**, 101–108 (2005).
- 31) Stichtenoth G., Jung P., Walter G., Johansson J., Robertson B., Curstedt T., Herting E., *Pediatr. Res.*, **59**, 407–411 (2006).
- 32) Lu K. W., Robertson B., Tausch H. W., *Biol. Neonate*, **88**, 46–53 (2005).
- 33) Lu K. W., Goerke J., Clements J. A., Tausch H. W., *Pediatr. Res.*, **57**, 237–241 (2005).
- 34) Tausch H. W., de la Serna J. B., Perez-Gil J., Alonso C., Zasadzinski J. A., *Biophys. J.*, **89**, 1769–1779 (2005).
- 35) Zuo Y. Y., Alolabi H., Shafiei A., Kang N., Policova Z., Cox P. N., Acosta E., Hair M. L., Neumann A. W., *Pediatr. Res.*, **60**, 125–130 (2006).
- 36) Kang N., Policova Z., Bankian G., Hair M. L., Zuo Y. Y., Neumann A. W., Acosta E. J., *Biochim. Biophys. Acta*, **1778**, 291–302 (2008).
- 37) Stenger P. C., Palazoglu O. A., Zasadzinski J. A., *Biochim. Biophys. Acta*, **1788**, 1033–1043 (2009).
- 38) Furuya T., Kiyota T., Lee S., Inoue T., Sugihara G., Logvinova A., Goldsmith P., Ellerby H. M., *Biophys. J.*, **84**, 1950–1959 (2003).
- 39) Lee S., Furuya T., Kiyota T., Takami N., Murata K., Niidome Y., Bredesen D. E., Ellerby H. M., Sugihara G., *J. Biol. Chem.*, **276**, 41224–41228 (2001).
- 40) Kitamura A., Kiyota T., Tomohiro M., Umeda A., Lee S., Inoue T., Sugihara G., *Biophys. J.*, **76**, 1457–1468 (1999).
- 41) Kiyota T., Lee S., Sugihara G., *Biochemistry*, **35**, 13196–13204 (1996).
- 42) Nakahara H., Nakamura S., Hiranita T., Kawasaki H., Lee S., Sugihara G., Shibata O., *Langmuir*, **22**, 1182–1192 (2006).
- 43) Nakahara H., Lee S., Sugihara G., Shibata O., *Langmuir*, **22**, 5792–5803 (2006).
- 44) Nakahara H., Lee S., Sugihara G., Chang C.-

-
- H., Shibata O., *Langmuir*, **24**, 3370–3379 (2008).
- 45) Nakahara H., PhD Thesis, Kyushu University (2008).
- 46) Nakahara H., Lee S., Krafft M. P., Shibata O., *Langmuir*, **26**, 18256–18265 (2010).