

主 論 文

博 士 論 文

肺胞上皮細胞のⅡ型→Ⅰ型形質転換と両細胞における
タンパク質輸送特性の解析

2009 年

広島大学大学院医歯薬学総合研究科
博士課程後期 薬学専攻
医療薬学講座 医療薬剤学研究室

池畑 美香

目 次

序論	1
本論	4
第I章 ラット肺胞上皮細胞の初代培養条件の最適化	4
第1節 アルカリホスファターゼ活性の評価	5
第2節 ラット初代培養肺胞上皮II型細胞の形態学的変化	6
第3節 I型細胞及びII型細胞特異的マーカー遺伝子のmRNA発現変動	8
第4節 小括	9
第II章 肺胞上皮細胞における各種高分子物質の取り込み活性の比較	10
第1節 DNA量測定に基づいた細胞数の評価	10
第2節 各種高分子物質の取り込みクリアランスの比較解析	11
第3節 Albumin及びinsulin取り込みに対する肺胞上皮II型及びI型細胞の寄与率の算出	13
第4節 小括	14
第III章 肺胞上皮細胞におけるalbumin輸送特性の解析	15
第1節 FITC-albuminの細胞内移行の基本特性	16
第2節 FITC-albumin取り込みのエネルギー依存性	19
第3節 FITC-albuminのエンドサイトーシス機構の解析	20
第4節 II型細胞内移行後のFITC-albuminの分解消失	25
第5節 肺胞上皮細胞におけるFITC-albuminの経細胞輸送	26
第6節 小括	27
第IV章 肺胞上皮細胞におけるinsulin輸送特性の解析	30
第1節 FITC-insulinの細胞内移行の基本特性	30
第2節 FITC-insulin取り込みのエネルギー依存性	32
第3節 FITC-insulinのエンドサイトーシス機構の解析	33
第4節 FITC-insulin取り込みに及ぼすタンパク質共存の影響	37
第5節 肺胞上皮細胞内から血中方向へのFITC-insulinの輸送	38
第6節 小括	39

結論	-----	43
謝辞	-----	45
実験の部	-----	46
論文目録	-----	54
参考文献	-----	55

略語一覽

ALI: acute lung injury
ARDS: acute respiratory distress syndrome
BAF: bafilomycin A₁
CINC-1: chemokine-induced neutrophilic chemoattractant-1
CPZ: chlorpromazine
DMEM/F-12: Dulbecco's modified Eagle medium-nutrient mixture F-12 (1:1)
DMSO: dimethyl sulfoxide
DNase I: deoxyribonuclease I from bovine pancreas
DNP: 2,4-dinitrophenol
2DOG: 2-deoxy-D-glucose
EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid
FBS: fetal bovine serum
FITC: fluorescein isothiocyanate
GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Hoechst 33258: bisbenzimidazole H 33258 fluorochrome trihydrochloride
IGFBP6: insulin-like growth factor binding protein 6
IgG: immunoglobulin G
IND: indomethacin
KGF: keratinocyte growth factor
MCD: methyl- β -cyclodextrin
mdr1a: multidrug resistance protein 1a
NaN₃: sodium azide
NYS: nystatin
PAO: phenylarsine oxide
PBS: phosphate-buffered saline
RITC: rhodamine B isothiocyanate
RTI40: rat type I cell 40-kDa protein
RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction
SDS: sodium dodecyl sulfate
SP-B: surfactant protein B
SSC: standard saline citrate
TEER: transepithelial electrical resistance
TGF β 1: transforming growth factor β 1

序 論

気管から 17-23 分岐した最先端部分を呼吸領域と言い、この部位には、ガス交換の場であると同時に薬物の吸収部位としても重要となる肺の最小単位である肺胞が存在する (Patton & Byron, 2007) (Fig. 1)。肺胞は、数がヒトで 4-5 億個であり、消化管に匹敵する 100 m^2 以上の表面積を有する (Ochsら, 2004)。肺胞上皮は、I 型細胞及び II 型細胞の 2 種類の上皮細胞から構成されており、肺胞表面の 90% 以上を覆っている I 型細胞は主にガス交換の場として機能している (Patton, 1996; Forbes, 2002)。I 型細胞は厚さ $0.1-0.2 \mu\text{m}$ の非常に薄い扁平上皮細胞であり、細胞内小器官に乏しく、肺胞表面から毛細血管までの距離は $0.5-1.0 \mu\text{m}$ しかない。一方、I 型細胞間に散在する立方形の II 型細胞は、肺胞表面の約 10% を覆うに過ぎないが、細胞数は I 型細胞を上回っている。また II 型細胞には apical 側に微絨毛があり、特有の細胞内小器官としてサーファクタントの産生・分泌を行っている lamellar body が存在している (Patton, 1996; Forbes, 2002)。肺胞表面は、この II 型細胞の lamellar body から分泌されるサーファクタントを含む薄い液体の層で覆われており、surfactant protein、albumin、immunoglobulin G (IgG)、transferrin 等の生理学的に重要なタンパク質が存在している (Patton, 1996)。通常、肺胞腔内の albumin 濃度は約 5 mg/mL と、血漿中の albumin 濃度 (40 mg/mL) と比較して極めて低く保たれている (Hastings ら, 2004)。しかし、急性呼吸窮迫症候群 (acute respiratory distress syndrome; ARDS) や急性肺障害 (acute lung injury; ALI) などの肺浮腫時には、サーファクタントの表面張力が著しく上昇し、それに伴い間質圧や血管周囲圧を低下させる。その結果、血管内から albumin をはじめとする血漿タンパク質などが肺胞腔内に漏出し、肺水腫が形成される。この

ため、病態からの回復過程において albumin 等のタンパク質の肺胞腔からのクリアランスは重要なプロセスであると考えられている (Ware & Matthay, 2000) (Fig. 2)。肺胞腔からのタンパク質のクリアランス機構としては、マクロ

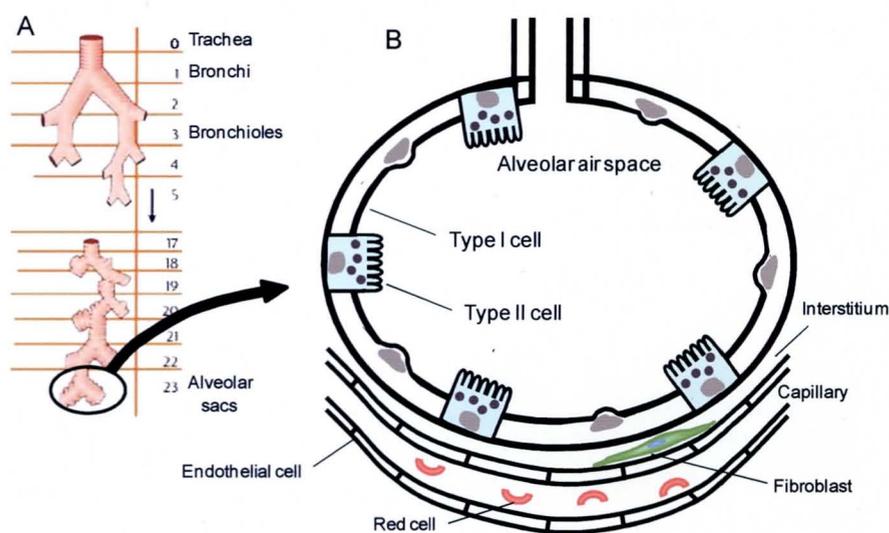


Fig. 1. The schematic diagrams of the airway (A) (Patton & Byron, 2007) and the alveolus (B).

ファージによる食作用、細胞間隙輸送 (paracellular route)、経細胞輸送 (transcytosis) 等の種々のメカニズムが提唱されているが、これまでのタンパク質輸送に関する研究報告や分子サイズを考慮するとエンドサイトーシスを介した細胞内取り込みと分解、あるいはトランスサイトーシスが最も重要な経路であると考えられる (Patton, 1996;

Hastings ら, 2004) (Fig. 3)。また肺浮腫等の肺障害時には、II 型細胞の増殖因子で

ある keratinocyte growth factor (KGF) の作用によって II 型細胞が増殖し、その後増殖した II 型細胞は、損傷部分の修復のために I 型細胞に形質転換することから、II 型細胞は I 型細胞の progenitor cell としての機能を有していることが知られている (MacDonald & Hill, 2002; Warburton & Bellusci, 2004)。

近年、バイオテクノロジーの進展により、多くのタンパク質・ペプチド性医薬品が供給されているが、その多くは消化管からの難吸収性及び短い生体内半減期のため、主に注射剤としての使用に限定されるのが現状である (Agu ら, 2001)。患者の Quality of Life あるいは安全性・利便性等を改善

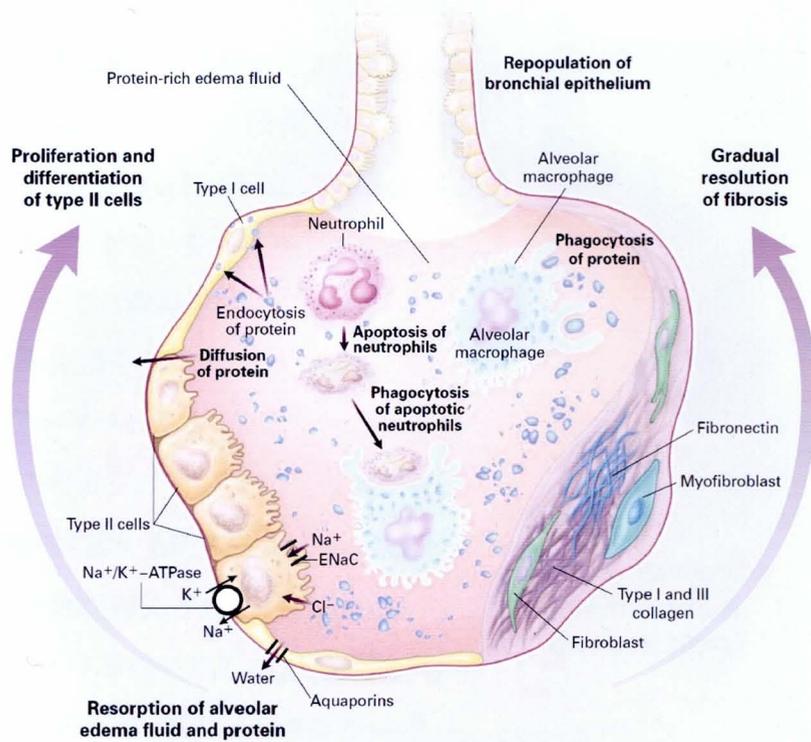


Fig. 2. Mechanisms important in the resolution of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. (Ware & Matthay, 2000)

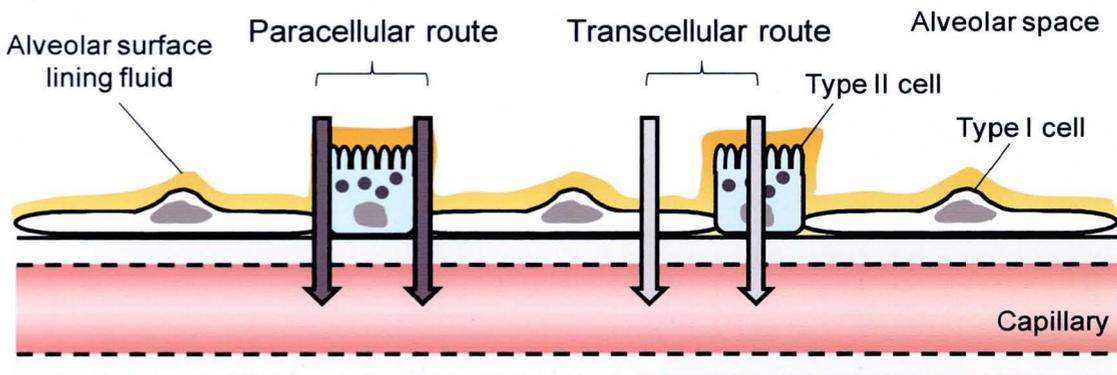


Fig. 3. Transport pathways across alveolar epithelia.

するためにも、注射剤に代わる製剤の開発が望まれている (Hamilton, 1995)。その候補の一つとして、吸収部位として肺に着目した吸入剤の開発が盛んに行われており、これによってタンパク質・ペプチド性製剤の全身作用を可能にすることが期待されている (Scheuch ら, 2006)。上述の肺の組織学的特徴から、肺は一般的にタンパク質・ペプチド性医薬品の吸収部位として適した環境を有すると考えられている。実際に、insulin を経肺投与した場合、消化管や鼻のような他の非侵襲的経路と比較してバイオアベイラビリティが大きいことが知られている (Owens ら, 2003)。このように、注射剤としての使用に限られていた insulin の経肺投与製剤に関する研究開発が進んでおり、臨床試験においても有効性や安全性が確認されている (Galan ら, 2006)。また insulin 以外にも、タンパク質性医薬品ではじめて吸入剤化



Fig. 4 . Exubera[®]
(Mastrandrea &
Quattrin, 2006).

された薬物として、分子量約 33,000 の嚢胞性線維症治療薬の recombinant human DNase が米国で承認されている (Frederiksen ら, 2006)。さらに、タンパク質・ペプチド性医薬品の growth hormone、calcitonin、granulocyte colony stimulating factor 等についても肺吸収に関する研究が行われている (Scheuch ら, 2006; Patton ら, 2000)。

しかしながら、insulin のドライパウダー型吸入製剤として開発された Exubera[®]は (Mastrandrea & Quattrin, 2006) (Fig. 4)、皮下投与時と比較して吸収が速やかであるものの、バイオアベイラビリティは約 10%であり充分とは言い難く、改良の余地があると思われる (Guntur & Dhand, 2007)。実際に、insulin の肺における吸収性を高める試みもなされている (Bahhady ら, 2007; Hussain ら, 2004)。このように、タンパク質・ペプチド性医薬品の吸収メカニズムを解明することは、吸収性に優れた経肺投与製剤の開発といった観点からも非常に重要であると考えられる。上記の albumin の場合と同様に、タンパク質・ペプチド性医薬品の吸収メカニズムの1つとして、トランスサイトーシスが考えられるが、その詳細については不明であり、特に肺胞上皮 I 型細胞及び II 型細胞間で比較検討した報告は乏しい。

本研究では、肺胞表面に存在する albumin 等のタンパク質のクリアランス機構、及び insulin をはじめとする経肺投与製剤の吸収機構を解明するために、ラット肺から初代培養した肺胞上皮細胞を用いて、II 型細胞から I 型細胞への形質転換と albumin または insulin の輸送システムとを関連づけて解析した。

本 論

第I章 ラット肺胞上皮細胞の初代培養条件の最適化

肺胞上皮は、形態的・機能的に異なるI型細胞及びII型細胞の2種類の上皮細胞から構成されている。肺胞表面積的にはI型細胞が90%以上と大部分を占めているが、細胞数で比較した場合、II型細胞はI型細胞数より多く存在している。これらを考慮すると、肺胞上皮細胞における物質輸送を評価する場合、I型細胞及びII型細胞の両細胞において比較検討し、その寄与率を明確にすることは重要であると考えられる。

物質の輸送特性を詳細に評価する手法として、*in vitro* 細胞モデルは有用であり、肺胞上皮細胞に限らずあらゆる組織の細胞モデルが汎用されている。一般に、細胞モデルは初代培養 (primary culture) と株化細胞 (cell line) に分類される。初代培養は、手技の煩雑さ、限られた単離細胞収量等の問題点を有するものの、株化細胞と比較して *in vivo* の特性をより反映したモデルとして位置づけられている (Steimer ら, 2005)。また、ラットを用いた肺胞上皮II型細胞の初代培養は再現性が高く、ヒトの初代培養と比較しても、類似した特性を示すことが報告されており、ラット初代培養肺胞上皮細胞は有用なモデルであると考えられている (Mathias ら, 1996)。

そこで本研究では、肺胞上皮細胞における物質輸送を評価するために、ラット初代培養肺胞上皮細胞を用いた。1970年代より、ラット肺からの肺胞上皮II型細胞の初代培養法に関して多くの報告がなされており、II型細胞の初代培養法が確立されている (Dobbs, 1990)。報告されている単離法の中で、本研究ではRichards らによって報告された不連続 Percoll 密度勾配遠心法によりII型細胞の単離を行った (Richards ら, 1987)。上述のように肺が障害を受けた場合には、その修復のためにII型細胞はI型細胞に形質転換するが、初代培養した肺胞上皮II型細胞も、通常の培養で培養日数の増加に伴ってII型細胞の特性を失い、I型様細胞へと形質転換することが知られている (Check ら, 1989)。さらに、I型細胞自身は分裂・増殖しないと考えられており、II型細胞は、II型細胞だけでなくI型細胞の progenitor cell としても機能している (Uhal, 1997)。また、II型細胞の形質転換を制御する種々の因子も報告されており、これらを制御することでII型細胞の特性を保持しようとする試みがなされている (Wang ら, 2007)。一方で、II型細胞から形質転換したI型様細胞はI型細胞の特性を示し、I型細胞のモデルとして汎用されている (Steimer ら, 2005; Williams, 2003)。なお、I型細胞の単離も手技の点からは可能であり、いくつかの報告がなされているが、II型細胞の単離法に比べて煩雑で収量はII型細胞の約10分の1程度である等の理由から、その利用が制限されてい

る (Chen ら, 2004; Sakagami, 2006)。

このような報告に基づき本章では、II型細胞及びI型細胞の両モデル実験系の確立を目的として、形質転換に影響を及ぼす因子として細胞の播種密度に着目し、II型細胞の特性を維持できる培養条件、あるいはI型様細胞へと形質転換させるための初代培養条件の最適化を図った。

第1節 アルカリホスファターゼ活性の評価

まず、ラット肺からII型細胞を単離後、培養日数に伴ってII型細胞としての特性をどの程度の速さで失うかを検討するために、肺胞上皮II型細胞で特に高い活性が認められるアルカリホスファターゼ活性を評価した (Edelson ら, 1988)。なお単離したII型細胞は、Richards らの報告に基づいて35-mm culture dish に 4×10^6 cells を播種した。単離直後のII型細胞または数日間培養した細胞のホモジネートを用いて、基質である *p*-nitrophenylphosphate と共に 37°C で15または30分間インキュベートし、生成した *p*-nitrophenol を測定することによりアルカリホスファターゼ活性を評価した。アルカリホスファターゼ活性は単離直後のII型細胞が最も高い活性を示し、培養6日目まで検討したところ培養日数の増加と共に速やかに活性は低下した (Fig. 5)。

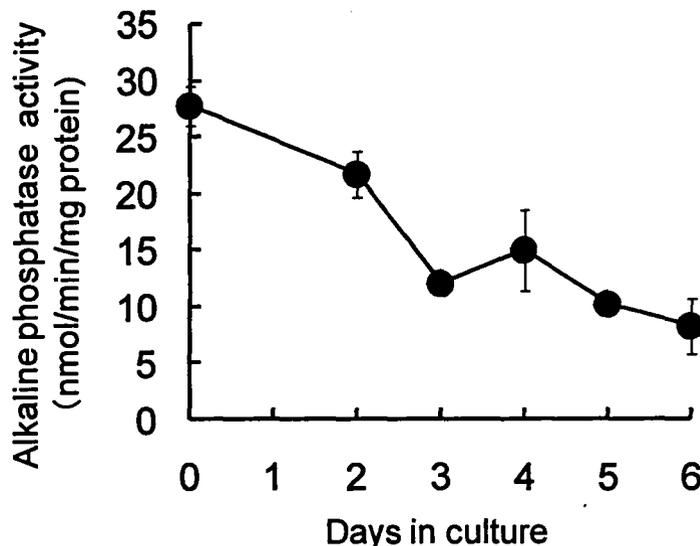


Fig. 5. Change in alkaline phosphatase activity in rat alveolar epithelial cells during culture.

The isolated type II cells or the cells cultured for indicated period after seeding 4×10^6 cells/35-mm dish were used. The homogenate of cells was incubated with *p*-nitrophenylphosphate at 37°C and *p*-nitrophenol was measured at O.D. 700nm. Each point represents the mean \pm SE ($n = 3-5$).

第2節 ラット初代培養肺胞上皮Ⅱ型細胞の形態学的変化

高密度で播種し培養した細胞は、低密度で播種し培養した細胞よりもⅡ型細胞の特性を長期間維持できると報告されていることから (Reynolds ら, 1999)、高密度で培養した後に出来るだけ短期間のうちに使用した細胞がⅡ型細胞の特性を、一方低密度で培養し、一定期間培養することによりⅠ型様細胞に形質転換させた細胞がⅠ型細胞の特性を示すと仮定した。播種密度を $1\sim 8\times 10^6$ cells/35-mm culture dish に、また培養日数を1~8日に変化させ、経日的に位相差顕微鏡により形態観察を行い、最もⅡ型細胞またはⅠ型細胞の形態を示す培養条件を検証した。なお、形態学的観察は細胞形態 (立方上皮または扁平上皮であるか否か) に加え、Ⅱ型細胞の有する形態学的特徴である lamellar body (層状封入体) の有無も評価の指標として行った。

まず、単離したⅡ型細胞は播種後完全に接着するまでに2日間を要したため、Ⅱ型細胞の培養条件として、培養期間は最低2日間必要であると考えられた。そこで、培養2日後にコンフルエントとなる播種密度を検討したところ、 4×10^6 cells/35-mm dish で播種した場合、2日間の培養ではコンフルエントに達しなかった (Fig. 6A)。そこで、播種細胞数を 5×10^6 cells/35-mm dish に増加させたところ、コンフルエントに達した (Fig. 6B)。また、 5×10^6 cells/35-mm dish で播種し、2日間培養した細胞は立方上皮様の形態を示し、Ⅱ型細胞に特有のオルガネラである lamellar body が観察された (Fig. 6B)。なお、 5×10^6 cells/35-mm dish で播種し3日間培養した細胞は、一部 lamellar body が消失しかけている細胞が認められた (Fig. 6C)。

一方、 4×10^6 cells/35-mm dish で播種し6日間培養した細胞は、完全にⅠ型様細胞に形態転換しておらず、lamellar body が一部残っていた (Fig. 7A)。そこで、播種密度を 2×10^6 cells/35-mm dish まで下げたところ、培養6日目において細胞はほぼ完全に扁平化してⅠ型様細胞に形態転換し、lamellar body もほとんど消失していることが観察された (Fig. 7B)。なお、播種密度を 1×10^6 cells/35-mm dish まで下げた場合、一部線維化している細胞が認められた (Fig. 7C)。従って、 5×10^6 cells/35-mm dish で播種し2日間培養した細胞 (Fig. 6B) は、Ⅱ型細胞の形態を保持しており、また 2×10^6 cells/35-mm dish で播種し6日間培養した細胞 (Fig. 7B) はⅠ型様細胞へと形態転換しているものと判断した。

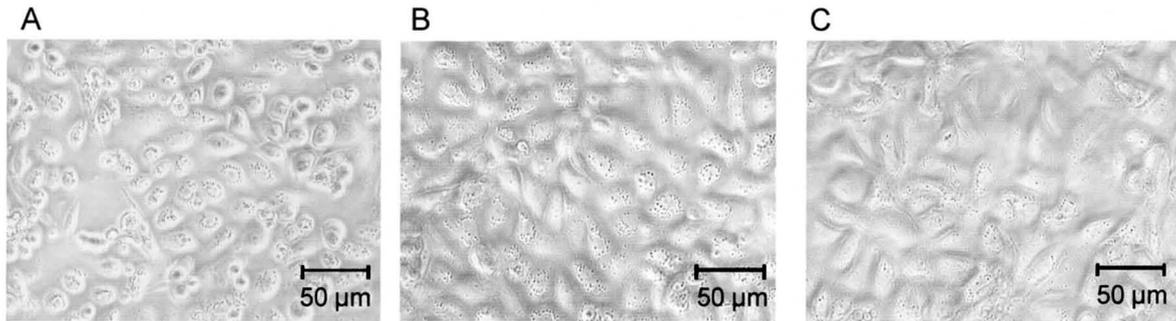


Fig. 6. Phase-contrast micrographs after seeding isolated rat alveolar type II epithelial cells.

A: The cells were cultured for 2 days after seeding 4×10^6 cells/35-mm dish. B: The cells were cultured for 2 days after seeding 5×10^6 cells/35-mm dish. C: The cells were cultured for 3 days after seeding 5×10^6 cells/35-mm dish. magnification x200.

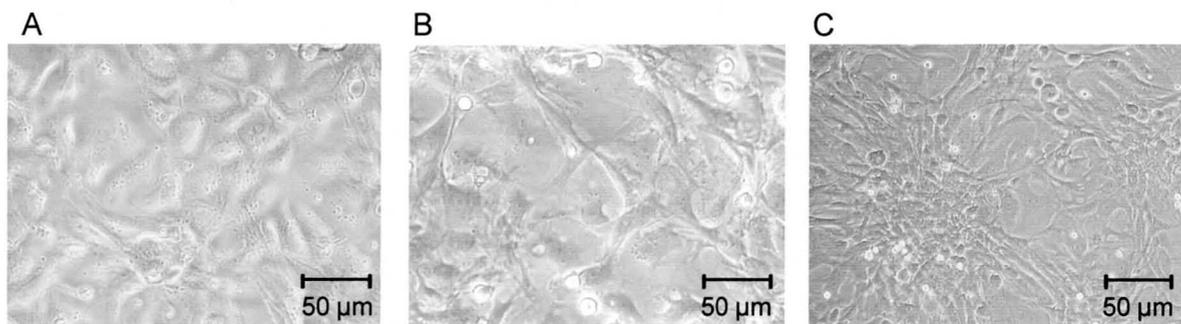


Fig. 7. Phase-contrast micrographs after seeding isolated rat alveolar type II epithelial cells.

The cells were cultured for 6 days after seeding 4×10^6 cells/35-mm dish (A), 2×10^6 cells/35-mm dish (B) or 1×10^6 cells/35-mm dish (C). magnification x200.

第3節 I型細胞及びII型細胞特異的マーカー遺伝子の mRNA 発現変動

前節においてII型細胞の形態を示した 5×10^6 cells/35-mm dish で播種し2日間培養した細胞、及びI型細胞の形態を示した 2×10^6 cells/35-mm dish で播種し6日間培養した細胞を用いて、II型細胞及びI型細胞に特異的に発現しているマーカー遺伝子の mRNA 発現の解析を行った。その結果、I型細胞マーカーである *rat type I cell 40-kDa protein (RTI 40)* (Gonzalez ら, 2005)、*insulin-like growth factor binding protein 6 (IGFBP6)* (Gonzalez ら, 2005)、*multidrug resistance protein 1a (mdr1a)* (McElroy & Kasper, 2004) 及び *caveolin-1* (Gonzalez ら, 2005; McElroy & Kasper, 2004) 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型細胞マーカーである *surfactant protein B (SP-B)* (Gonzalez ら, 2005) 及び *chemokine-induced neutrophilic chemoattractant-1 (CINC-1)* (Gonzalez ら, 2005) 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) (Table 1)。すなわち、各細胞のマーカー遺伝子の mRNA 発現解析における結果は、先の細胞形態の結果と対応していた。以上の結果を踏まえて、 5×10^6 cells/35-mm dish で播種し2日間培養した細胞をII型細胞、 2×10^6 cells/35-mm dish で播種し6日間培養した細胞をI型様細胞として以降の実験を行った。

Table 1. Change in the expression level of marker gene mRNA in rat alveolar epithelial cells

Gene name	day 2	day 6	Ratio (day 6/day 2)
Type I cell marker			
<i>RTI40</i>	0.12 ± 0.07	1.55 ± 0.19 **	12.6
<i>IGFBP6</i>	0.37 ± 0.07	2.00 ± 0.46 *	5.5
<i>mdr1a</i>	0.15 ± 0.10	2.17 ± 0.65 *	14.2
<i>caveolin-1</i>	0.21 ± 0.15	11.26 ± 1.67 **	52.5
Type II cell marker			
<i>SP-B</i>	1.26 ± 0.12	0.19 ± 0.02 **	0.15
<i>CINC-1</i>	1.17 ± 0.12	0.03 ± 0.01 **	0.03

Total RNA was extracted from the cells cultured for 2 or 6 days after seeding 5 or 2×10^6 cells/35-mm dish, respectively. The mRNA expression was analyzed by real-time PCR. Each value represents the mean ± SE of relative expression level normalized by *GAPDH* mRNA (n = 3). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. day 2.

第4節 小括

肺胞上皮のI型細胞及びII型細胞間における物質輸送を比較検討することを目的として、本章ではラットから肺胞上皮II型細胞を精製単離し、初代培養肺胞上皮II型細胞及びI型細胞のモデル実験系の確立を試みた。まず、Percollを用いた不連続密度勾配遠心によりラット肺から肺胞上皮II型細胞を単離したところ、収量は約 30×10^6 cells/ratであり、この値は以前に報告された値と同程度であった (Richards ら, 1987)。

第1節では、II型細胞で特に高い活性が認められるアルカリホスファターゼ活性を評価した結果、アルカリホスファターゼ活性は、単離したII型細胞を培養した後速やかに低下した。このような播種開始後の急激な活性低下は過去の報告と一致しており (Edelson ら, 1988)、培養日数の増加に伴いII型細胞としての特性が消失していくことが確認された。

そこで第2節では、播種密度及び培養日数を変化させることによりII型細胞からI型細胞への形質転換の制御を試み、II型細胞及びI型細胞としての特性を最もよく示す培養条件を検討した。その結果、各培養条件における細胞形態観察により、 5×10^6 cells/35-mm dish で播種し2日間培養した細胞はII型細胞の形態を示し、一方 2×10^6 cells/35-mm dish で播種し6日間培養した細胞は、I型細胞へと形態転換していることが確認された。

次に、I型細胞及びII型細胞の特異的マーカー遺伝子が数多く発見されていることから、これらの mRNA 発現を解析することにより、上記で選択されたII型細胞及びI型細胞モデルとしての培養条件が適しているか否かを検討した。今回選択したI型細胞マーカーである *RTI 40*、*IGFBP6*、*mdr1a* 及び *caveolin-1* の mRNA 発現は培養6日後の細胞において、一方II型細胞マーカーである *SP-B* 及び *CINC-1* の発現は培養2日後において著しく高く、これらの結果は先の細胞形態の結果と対応していた。Gonzalez らの報告 (2005) によると、単離したII型細胞を形質転換させたI型細胞と単離直後のI型細胞の間には、I型細胞及びII型細胞マーカーの mRNA 発現に相関性が認められないマーカーも一部存在していることが指摘されている。しかし、今回の検討したマーカー遺伝子の mRNA 発現は、本研究におけるII型細胞及びI型細胞において、各細胞のマーカー遺伝子として合致する発現プロファイルを示した。さらに当研究室において、I型細胞マーカー *mdr1a* の機能タンパク質である P-glycoprotein (P-gp) の機能を評価した結果、培養6日後の細胞で観察された P-gp 機能は、培養2日後の細胞ではほとんど認められなかった (未発表データ)。

以上の結果を踏まえて、 5×10^6 cells/35-mm dish で播種し2日間培養した細胞はII型細胞モデルとして、 2×10^6 cells/35-mm dish で播種し6日間培養した細胞はI型細胞モデルとして活用できるものと判断した。

第II章 肺胞上皮細胞における各種高分子物質の取り込み活性の比較

肺胞上皮におけるタンパク質の輸送に関して、これまでに多くの研究がなされている。例えば、肺胞腔中に存在するタンパク質として albumin、IgG 及び transferrin 等については、関与するレセプターの情報も含め、肺胞上皮細胞における輸送機構に関して既に報告がなされている (Kim & Malik, 2003)。しかし、各タンパク質間の輸送活性の違いや、I型細胞あるいはII型細胞のいずれかで輸送効率が高いかに関しては不明な点が多い。そこで本章では、第I章において確立したII型細胞及びI型細胞モデルを用いて、代表的な高分子物質のクリアランスを比較検討した。さらに、本研究の *in vitro* における結果を *in vivo* へ外挿することを視野に入れて、肺における各種タンパク質の取り込みに対する、II型細胞及びI型細胞の寄与率の算出を試みた。

第1節 DNA量測定に基づいた細胞数の評価

一般に、細胞における物質の取り込み活性の評価法として、細胞タンパク当たりの取り込み量を用いられる。しかし、肺胞上皮における物質取り込みに対するII型細胞及びI型細胞の各寄与率を算出するためには、肺における各細胞の細胞数あるいは表面積に関する情報に基づいて、細胞当たりあるいは表面積当たりの取り込み活性を評価する必要があると考えられる。そこで本研究では、II型細胞及びI型細胞モデルにおける細胞数を、DNA量から推定することにより細胞当たりの取り込み活性の算出を試みた。まず単離直後の既知数のII型細胞を用いて、そのDNA量を測定することにより、II型細胞1個当たりのDNA量を7.0 pgと算出した。一般に細胞のDNA量は、細胞種によらず不変の値 (7.0 pg/cell) を示し (Downs & Wilfinger, 1983)、今回の値はこの値と一致するものであった。次に、先の章で確立したII型細胞及びI型様細胞として使用する場合の培養条件においてDNA量を測定し (Fig. 8A)、この値を7.0 pg/cellを用いて細胞数に換算した (Fig. 8B)。さらに、DNA量の測定を行ったサンプルのタンパク量も測定すること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 13.2×10^6 cells/mg protein、I型様細胞は 5.7×10^6 cells/mg protein となった (Fig. 8C)。II型細胞における値はI型様細胞の約2.3倍であり、この結果は、II型細胞の方がI型細胞よりも小さな細胞であるという事実と対応していると考えられる。

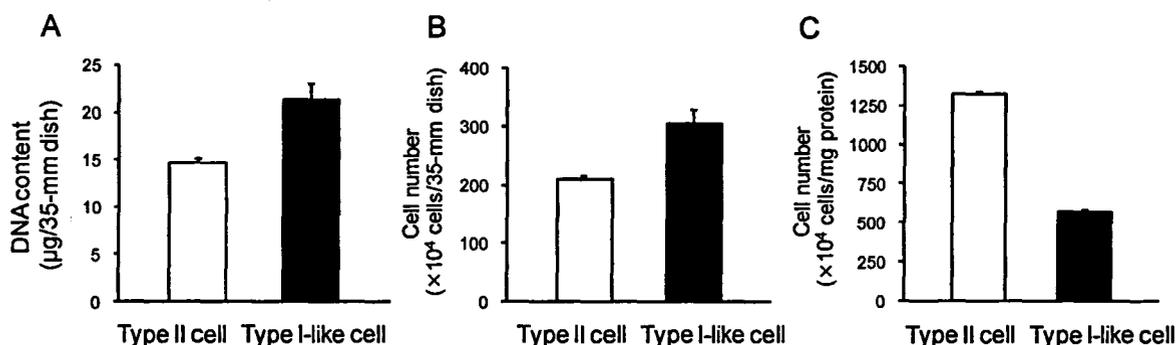


Fig. 8. Quantitative analysis of DNA content and cell number in rat alveolar epithelial cells.

A: DNA content per 35-mm dish was measured in alveolar type II and type I-like cells. B: The DNA content measured in A was converted into the cell number using 7.0 pg DNA/type II cell. C: The cell number per mg cell protein. Each column represents the mean \pm SE (n = 3).

第2節 各種高分子物質の取り込みクリアランスの比較解析

II型細胞及びI型様細胞において、各種高分子物質の37°Cにおける取り込みクリアランスを、まずタンパク量当たりで算出した後 (Fig. 9A)、第1節で求めたタンパク量当たりの細胞数を用いることにより細胞1個当たりの取り込みクリアランスに変換した (Fig. 9B)。なお、各基質の取り込み量は、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識体を用いて定量した。その結果いずれの評価法においても、FITC-albumin 及び FITC-insulin の取り込みクリアランスは他の高分子 (FITC-IgG, FITC-transferrin, FITC-dextran; 4 及び 70 kDa) と比較して極めて高かった。Dextran は液性エンドサイトーシスマーカーであり、その取り込みに特殊な輸送系は関与しないと考えられている。従って、albumin や insulin の取り込み過程には、何らかの特殊な輸送システムが関与することが示唆された。さらに、細胞当たりの取り込みクリアランスで評価した場合、検討した高分子物質の中で FITC-albumin の取り込みクリアランスが最も高く、また II 型細胞における値は I 型様細胞と比較して高値を示した。一方、FITC-insulin における検討では両細胞でほぼ同程度の取り込みクリアランスを示した。

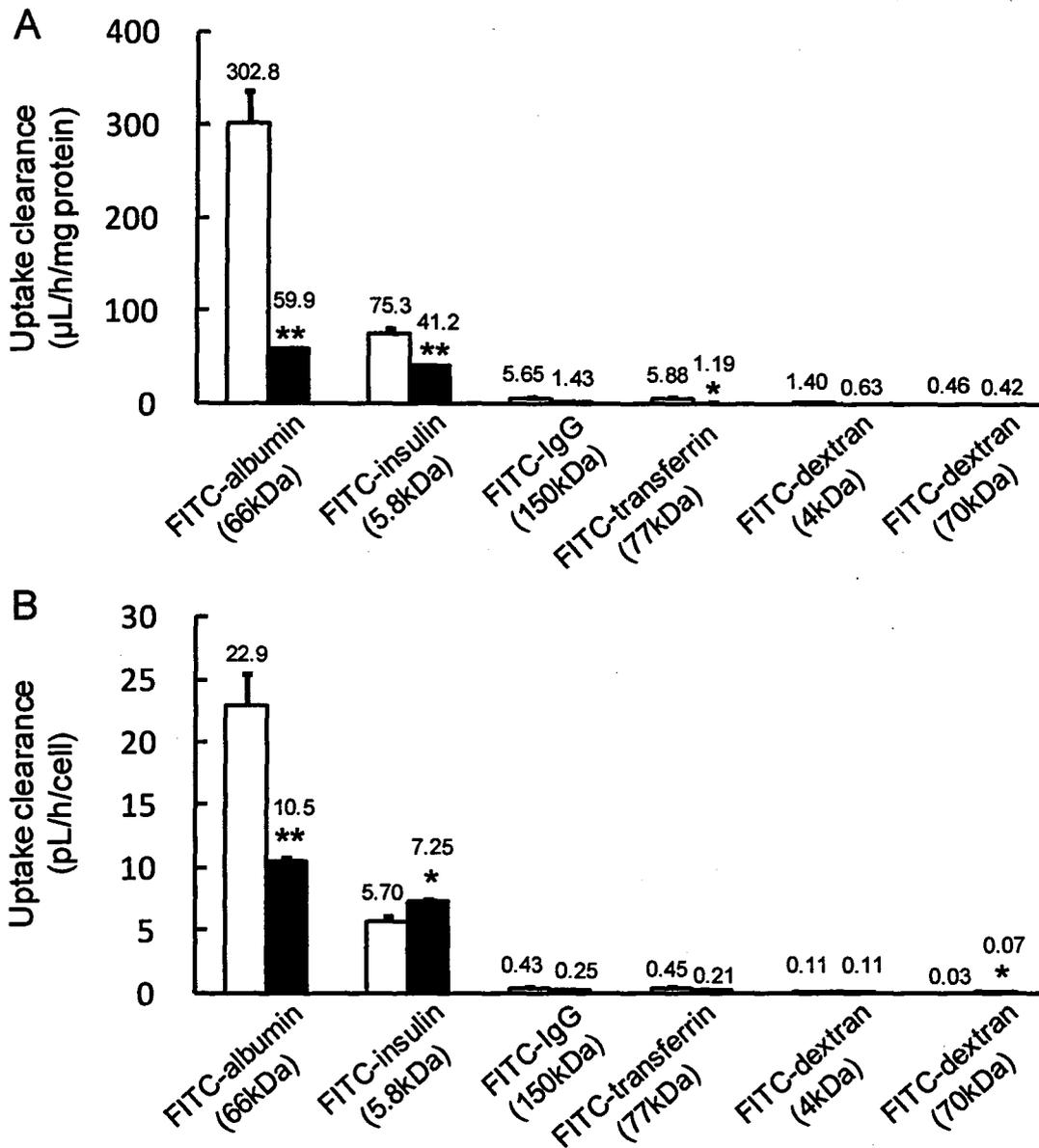


Fig. 9. Apparent uptake clearance of various substrates in alveolar epithelial cells.

The apparent uptake (total cell association) clearance ($\mu\text{L}/\text{h}/\text{mg}$ protein) was measured at 37°C for 60 min in type II (open column) and type I-like (closed column) cells. The clearance per cell ($\text{pL}/\text{h}/\text{cell}$) was estimated from the data of the clearance per mg protein, using cell numbers/mg protein in each type of cells. Each column represents the mean \pm SE ($n = 3-4$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. type II cell.

第3節 Albumin 及び insulin 取り込みに対する肺胞上皮 II 型及び I 型細胞の寄与率の算出

肺胞表面における II 型細胞及び I 型細胞の寄与率を算出するために、肺における細胞数比、II 型細胞数 : I 型細胞数 = 1.5 : 1 を用いた (Patton, 1996)。温度依存的な取り込みクリアランスは、FITC-albumin では II 型細胞 : I 型細胞 = 2.4 : 1 であったことから、細胞数比を用いることにより取り込みの寄与率は II 型細胞 : I 型細胞 = 78 : 22 と見積もられた (Fig. 10)。また FITC-insulin においては、取り込みクリアランスが II 型細胞 : I 型細胞 = 0.77 : 1 であったことから、寄与率は II 型細胞 : I 型細胞 = 54 : 46 と算出された (Fig. 10)。

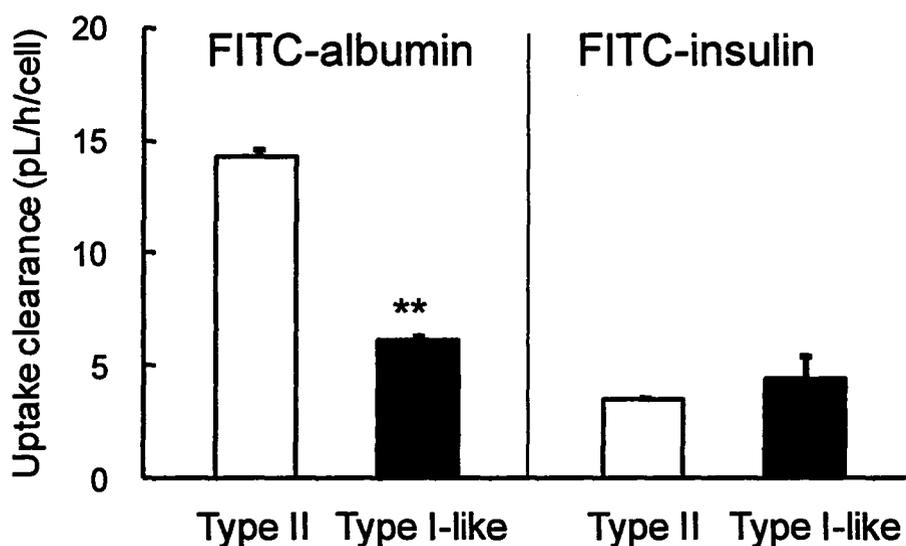


Fig. 10. Uptake clearance per cell of FITC-albumin and FITC-insulin in alveolar type II and type I-like cells.

The uptake of FITC-albumin or FITC-insulin was estimated by subtracting cell surface binding at 4°C from total cell association at 37°C in type II (open column) and type I-like (closed column) cells. Each column represents the mean \pm SE (n = 3-4). ** $p < 0.01$ vs. type II cell.

第4節 小括

第1節では、*in vitro*の細胞実験により求められた取り込み活性から、*in vivo*すなわち肺全体での取り込み活性を予測することを目的として、細胞1個当たりの取り込み活性を評価した。肺での取り込み活性を予測する方法として、形態的に異なる2種類のII型細胞及びI型細胞の細胞数あるいは表面積の情報に基づいた評価法が考えられる。本実験条件では、各細胞の表面積を正確に算出することは困難と考えられたため、各細胞の細胞数を評価することにより*in vivo*への外挿を試みた。本研究では細胞数を評価するために、細胞のDNA量を測定した(Cesaroneら, 1979)。なお、トリプシン処理により細胞を単一にし、これらをカウントすることにより細胞数の評価を試みたが、完全に単一にすることが困難であり正確な評価は不可能であった。単離直後のII型細胞のDNA量(7.0 pg/cell)、II型細胞・I型様細胞のDNA量及びタンパク量により、タンパク量当たりの細胞数を見積もったところ、II型細胞の値はI型細胞の約2.3倍となった。この結果は、II型細胞の方がI型細胞よりも小型の細胞であることと対応していると考えられる。

この値を用いて第2節では、細胞1個当たりの各種高分子物質の取り込み活性を算出した。その結果、II型細胞及びI型様細胞共にFITC-albumin及びFITC-insulinの取り込み活性が特に高くかつ、これらはdextranの取り込み活性よりも極めて高かったことから、何らかの特殊な輸送システムが関与していることが示唆された。

第3節では、FITC-albumin及びFITC-insulinの温度依存的な取り込み活性について、肺におけるII型細胞及びI型細胞の寄与率の算出を試みた。ここでは、肺においてII型細胞はI型細胞よりも約1.5倍多く存在していると仮定することにより、各細胞の寄与率を見積もった(Patton, 1996)。温度依存的な細胞1個当たりの取り込みクリアランスから算出したところ、肺におけるFITC-albuminの取り込みの寄与率はII型細胞:I型細胞=78:22と見積もられた。また、肺におけるFITC-insulinの取り込みの寄与率はII型細胞:I型細胞=54:46となった。現在のところ、肺におけるII型細胞及びI型細胞の寄与率を見積もった報告は見当たらない。従って今回の手法は、肺胞上皮細胞を用いた物質輸送実験の結果から、*in vivo*での外挿を視野に入れた肺における輸送効率を予測する上で有用であると考えられる。また、細胞の有する取り込み能力に基づいて考えた場合、II型細胞は表面積的に占める割合は小さいものの細胞数ではI型細胞よりも多く、特にalbuminに関してはII型細胞で高い取り込み活性を示したように、II型細胞はタンパク質の取り込みにおいて重要な役割を担っていることが示唆された。

第 III 章 肺胞上皮細胞における albumin 輸送特性の解析

第 II 章において、FITC-albumin の取り込み活性は他の高分子物質 (insulin, IgG, transferrin, dextran) と比較して、II 型細胞及び I 型様細胞ともに高いことが示された。これまでに、albumin のようなタンパク質の輸送機構に関する研究から、最も可能性のある経路としては、エンドサイトーシスによる取り込み経路が有力である (Hastings ら, 2004; Kim & Malik, 2003)。エンドサイトーシスは、小胞形成に関与する機能タンパクの違いにより分類した場合、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 (Conner & Schmid, 2003; Mayor & Pagano, 2007) (Fig. 11)。クラスリン被覆小胞は、クラスリン重鎖と軽鎖各 3 本からなる三脚構造が、受容体タンパク質やアダプタータンパク質 AP2 と共に形成するサッカーボール様の膜陥入構造体である (直径~120 nm)。クラスリン介在性エンドサイトーシスは、細胞質側をクラスリンで覆われた膜領域がくびれて陥入した後、小胞として摘み取られるものである。エンドサイトーシス経路の中でクラスリン介在性エンドサイトーシスは最もよく研究されており、この経路を介して内在化するレセプターも transferrin receptor、low density lipoprotein receptor (LDLR) family 等、数多く報告されている (Conner & Schmid, 2003)。

一方、カベオラとは直径~60 nm のフラスコ状の膜陥入構造体であり、クラスリンとは形態的に異なる全く別の物質取り込み装置であると考えられている。カベオラは、カベオリンというタンパク質より形成され、一部の細菌毒素やウイルスの細胞内侵入経路であることも明らかになっている。また、カベオラにはコレステロールやスフィンゴ糖脂質などの脂質に加え、G タンパク質や各種キナーゼなどの細胞内情報伝達に関わるタンパク質が集まっており、細胞内情報伝達装置でもあると言われている (Conner & Schmid, 2003; Mayor & Pagano, 2007)。

これまでに、肺胞上皮 II 型細胞における albumin の取り込みには、gp60 (albondin) 及びカベオラが関与することが報告されている (John ら, 2001)。一方、当研究室の検討では、培養肺胞上皮 II 型細胞 RLE-6TN における albumin の取り込みには、クラスリン介在性エンドサイトーシスが関与することを報告した (Yumoto ら, 2006)。従って、肺胞上皮 II 型細胞における albumin の取り込み機構に関しては未だ議論の余地が残されている。さらに、I 型細胞における albumin の取り込みに関しては報告が少なく、II 型細胞との直接比較も行なわれていない。

そこで本章では、FITC-albumin の取り込み機構について、エンドサイトーシス経路を中心に II 型細胞及び I 型様細胞間で比較検討した。

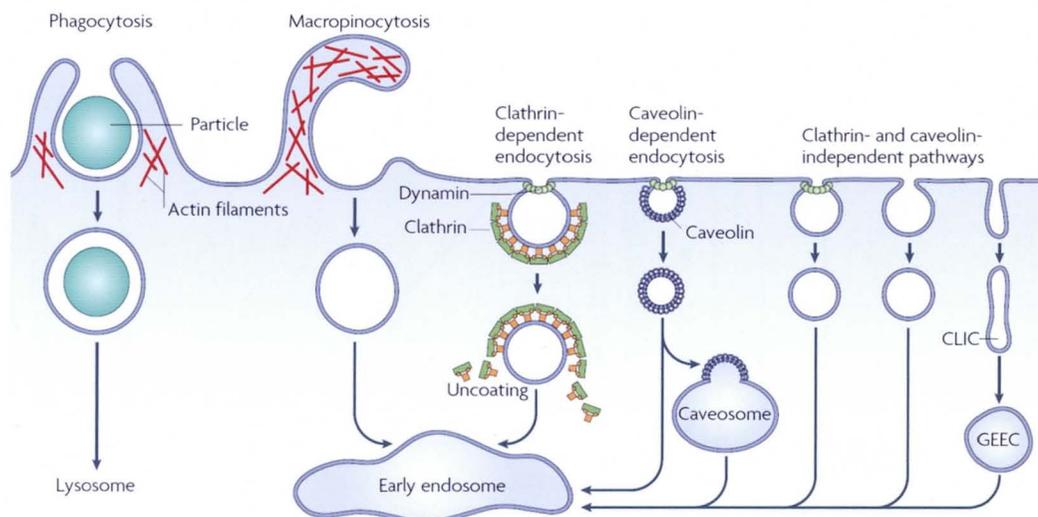


Fig. 11. The classification of endocytic pathway (Mayor & Pagano, 2007).

第1節 FITC-albumin の細胞内移行の基本特性

Albumin は分子量約 67,000 の酸性タンパク質で血中に豊富に存在しており、血漿中タンパク質に占める割合は約 60% である。Albumin は主に膠質浸透圧の調節に関与しているが、アミノ酸、リン脂質、ホルモン、ビリルビン、薬物など様々な物質のキャリアとして、生体の恒常性維持に重要な役割を果たしている (Hankins, 2006)。本章では、FITC-albumin を用いて、ラット初代培養肺胞上皮細胞における取り込み特性について検討した。

FITC-albumin の細胞内移行特性を解析するために、まず FITC-albumin 取り込みの時間及び温度依存性について検討した。なお、以降の検討では、取り込み活性は細胞タンパク量当たりの取り込み量により評価した。37°C における FITC-albumin の取り込みは、II 型細胞及び I 型様細胞共に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 (Fig. 12A)。また、II 型細胞における取り込み活性が I 型様細胞よりも高い活性を示したことは、前章で述べたことと一致していた。一方、インキュベーション 60 分における 4°C の値は、37°C に比較し顕著に低く、明確な温度依存性を示した (Fig. 12B)。さらに、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、FITC-albumin (50 µg/mL) と 37°C または 4°C で 60 分間インキュベーションした II 型細胞を観察したところ、37°C においては細胞内に FITC の蛍光が点状に認められたが、4°C においてはほとんど認められなかった (Fig. 13)。これらの結果より、II 型細胞及び I 型様細胞における FITC-albumin 取り込みには著しい温度依存性が認められ、特殊輸送系の関与が考えられた。

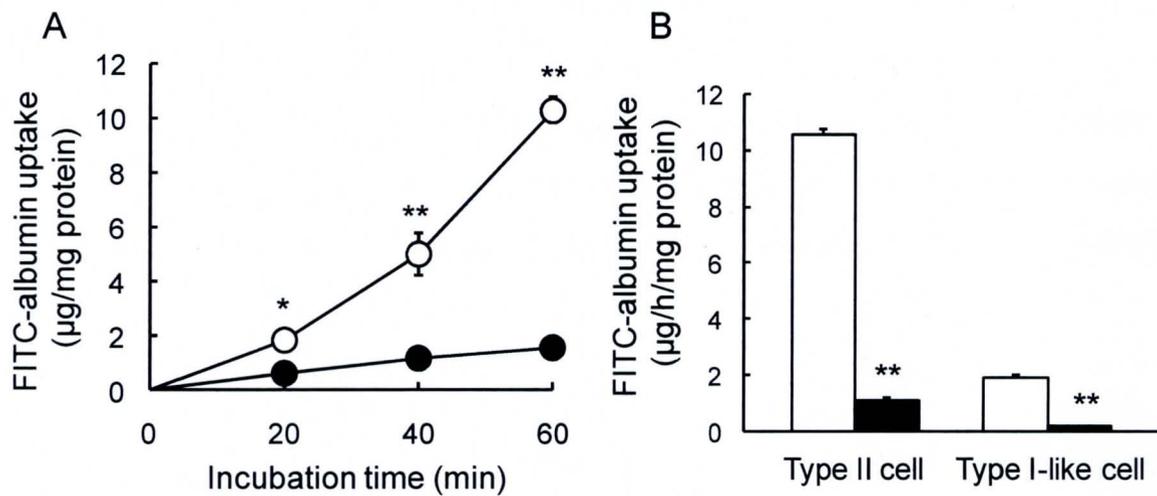


Fig. 12. Time course and temperature-dependence of FITC-albumin uptake in alveolar type II and type I-like cells.

A: The uptake of FITC-albumin (50 $\mu\text{g/mL}$) was measured at 37°C in type II (open circle) and type I-like (closed circle) cells. B: The uptake of FITC-albumin (50 $\mu\text{g/mL}$) was measured at 37°C (open column) or 4°C (closed column) for 60 min in type II and type I-like cells. Each point or column represents the mean \pm SE (n = 3-5). A: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. type I-like cell. B: ** $p < 0.01$ vs. 37°C.

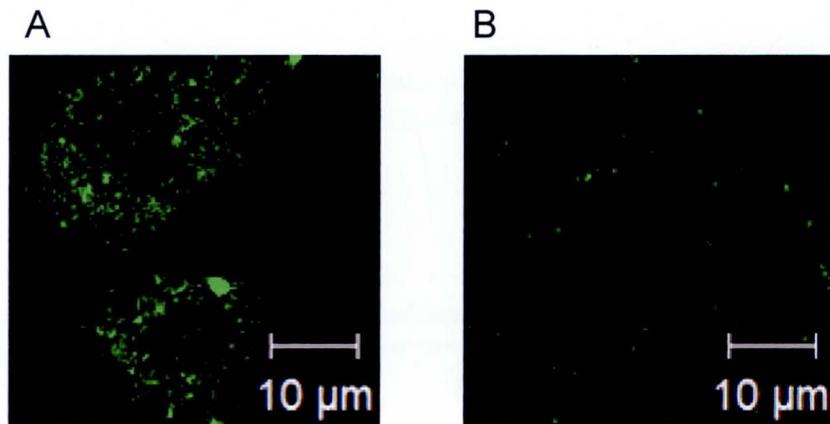


Fig. 13. Confocal laser scanning micrographs of type II epithelial cells.

After FITC-albumin (50 $\mu\text{g/mL}$) uptake by type II cells grown on glass bottom culture dishes for 60 min at 37°C (A) or at 4°C (B), cells were observed by confocal laser scanning microscopy.

そこで、II 型細胞における FITC-albumin 取り込みの濃度依存性について検討した。その結果、FITC-albumin 取り込みは非線形性を示し、飽和過程の存在が示された (Fig. 14)。さらに、Eadie-Hofstee plot により解析したところ、FITC-albumin の取り込みには、親和性の異なる少なくとも 2 種の取り込み機構の存在が示唆された (Fig. 14)。また、Michaelis-Menten 式より、速度論的パラメーターを算出したところ、Table 2 に示す値が得られた。さらに、以後の実験に使用した 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ における各輸送システムの寄与率は、高親和性輸送が 98%、低親和性輸送が 0.9%、非特異的な輸送 (結合) が 1.1%と算出された。

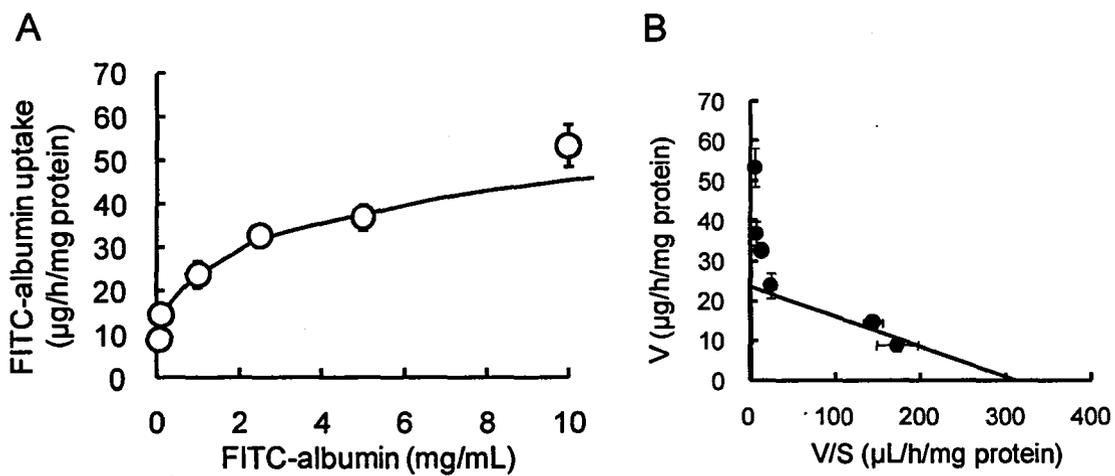


Fig. 14. Concentration-dependence of FITC-albumin uptake by alveolar type II cells.

A: The uptake of FITC-albumin (0.05-10 mg/mL) was measured at 37°C. B: Eadie-Hofstee plot of the data in A. Each point represents the mean \pm SE (n = 4).

Table 2. Kinetic parameters of FITC-albumin uptake by alveolar type II cells.

	Km	Vmax	K
	(mg/mL)	($\mu\text{g}/\text{h}/\text{mg}$ protein)	($\mu\text{L}/\text{h}/\text{mg}$ protein)
High affinity	0.076	23.7	2.00
Low affinity	30.5	50.8	

These parameters were estimated by analyzing data (Fig. 14A) using Michaelis-Menten equation.

Michaelis-Menten equation

$$V = \frac{V_{\max 1} \cdot S}{K_{m1} + S} + \frac{V_{\max 2} \cdot S}{K_{m2} + S} + K \cdot S$$

V: rate of FITC-albumin uptake ($\mu\text{g}/\text{h}/\text{mg}$ protein)

V_{\max} : maximal rate of FITC-albumin ($\mu\text{g}/\text{h}/\text{mg}$ protein)

K_m : Michaelis-Menten constant (mg/mL)

K: diffusion/binding constant ($\mu\text{L}/\text{h}/\text{mg}$ protein)

S: concentration of FITC-albumin (mg/mL)

第2節 FITC-albumin 取り込みのエネルギー依存性

エンドサイトーシスは、多数の因子が協調的に働くことにより細胞膜の一部が陥没して細胞内に物質を取り込む、エネルギーを要するダイナミックなイベントである。また、レセプター介在性エンドサイトーシスの制御因子の1つとして、エンドソーム内の酸性化が挙げられる (Nelson & Harvey, 1999)。細胞内に取り込まれたリガンドとレセプターの解離に、このエンドソーム内の酸性化が必要であり、酸性化はエンドソーム膜に存在する vacuolar H^+ -ATPase がエンドソーム内にプロトンを供給することによりなされることが知られている (Nelson & Harvey, 1999)。

そこで、FITC-albumin の細胞内移行に及ぼすエネルギー代謝阻害剤 sodium azide (NaN_3)、2,4-dinitrophenol (DNP) の影響、及び vacuolar H^+ -ATPase 阻害剤 bafilomycin A_1 (BAF) の影響について検討を行った。まず、 NaN_3 、DNP で10分間前処置した後、それらを FITC-albumin と共存させて取り込み実験を行ったところ、FITC-albumin の取り込みはII型細胞ではコントロールの約10-20%まで、I型様細胞ではコントロールの約35%まで低下した (Fig. 15)。BAFは30分間の前処置のみを行い、その後細胞を洗浄し、FITC-albumin を添加しインキュベーションしたところ、II型細胞ではコントロールの約18%に、I型様細胞では約40%に有意に低下した (Fig. 15)。従って、II型細胞及びI型様細胞いずれにおいても、FITC-albumin の細胞内移行にエネルギー依存性及びレセプター介在性エンドサイトーシスの関与が示された。

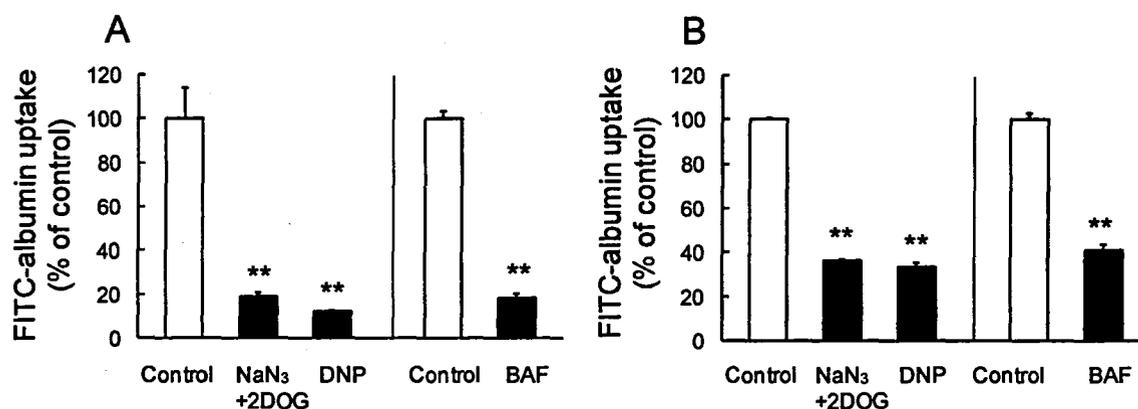


Fig. 15. Effects of metabolic inhibitors and a vacuolar H⁺-ATPase inhibitor on FITC-albumin uptake by alveolar type II (A) and type I-like (B) epithelial cells.

The uptake of FITC-albumin (50 µg/mL) was measured at 37°C for 60 min. Cells were treated with 10 mM sodium azide (NaN₃) plus 5 mM 2-deoxy-D-glucose (2DOG), 1 mM 2,4-dinitrophenol (DNP), or 100 nM bafilomycin A₁ (BAF). Each column represents the mean ± SE (n = 3-6). ***p*<0.01 vs. control.

第3節 FITC-albumin のエンドサイトーシス機構の解析

前節において、レセプター介在性エンドサイトーシスの関与が示唆されたことから、その詳細な機構について検討した。まず、FITC-albumin の細胞内移行におけるクラスリン介在性エンドサイトーシスの関与について II 型細胞及び I 型様細胞間で比較解析した。2 種類の阻害剤、すなわちクラスリンと被覆小胞の結合に必要となるアダプタータンパク質 AP-2 のクラスリン小胞への集合を阻害する chlorpromazine (CPZ) (Wang ら, 1993) 及びクラスリンの隣り合う 2 つのシステイン残基と結合し、安定な 5 員環構造を形成することでクラスリン介在性エンドサイトーシスを阻害する phenylarsine oxide (PAO) (Ruckert ら, 2003) を用いて検討を行った。なお阻害剤は、PAO では 10 分間の前処置のみ、CPZ では 10 分間の前処置に加えて FITC-albumin と共存させてインキュベーション中も処置を行った。CPZ 及び PAO 共に、II 型及び I 型様細胞いずれの細胞においても、FITC-albumin の取り込みを低下させた (Fig. 16)。また、これらの阻害剤の阻害効果は、II 型細胞の方が I 型様細胞よりも強い傾向を示したことから、クラスリン介在性エンドサイトーシスの寄与は II 型細胞の方が高いことが推察された。

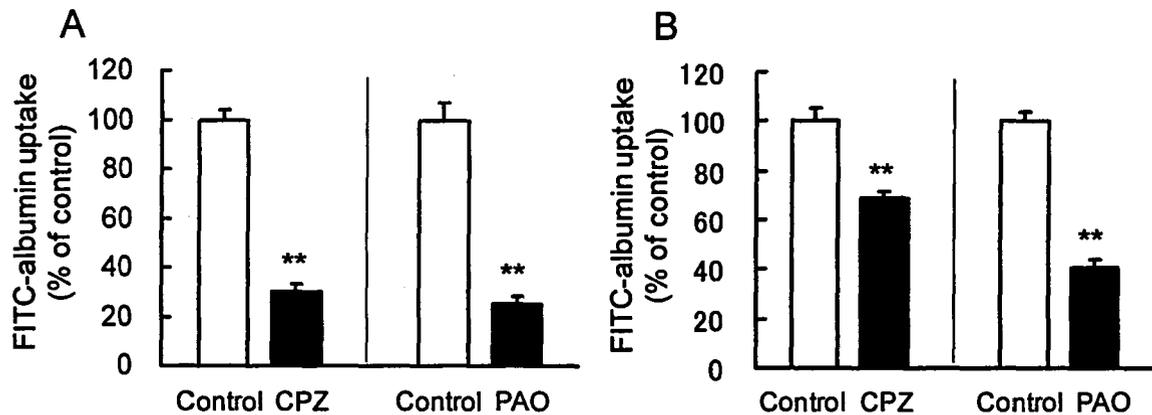


Fig. 16. Effects of inhibitors of clathrin-mediated endocytosis on FITC-albumin uptake by alveolar type II (A) and type I-like (B) epithelial cells.

The uptake of FITC-albumin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was measured at 37°C for 60 min. Cells were treated with 84.4 μM (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) chlorpromazine (CPZ) or 3 μM phenylarsine oxide (PAO) as described in Materials and Methods. Each column represents the mean \pm SE (n = 3). ** $p < 0.01$ vs. control.

さらに、クラスリン介在性エンドサイトーシスを阻害することが知られている、高浸透圧及びカリウム枯渇処置の影響についても検討を行った。これらの処置は、膜に介在しているクラスリン格子を取り除き、クラスリン被覆小胞を消滅させることにより、クラスリン介在性エンドサイトーシスを阻害すると考えられている (Hansen ら, 1993)。高浸透圧処置は、高浸透圧 buffer (920 mOsm) でプレインキュベーションした後、基質を含む高浸透圧 buffer でインキュベーションを行った。カリウム枯渇処置は、まず、カリウムフリーの低浸透圧 (146 mOsm) buffer で5分、続いてカリウムフリーの等張 buffer (311 mOsm) で5分プレインキュベーションすることにより、細胞質内のカリウムを枯渇させた。その後、基質を含むカリウムフリーの等張 buffer でインキュベーションすることにより評価した。その結果、カリウム枯渇処置では阻害効果が小さいものの、両処置により II 型細胞及び I 型様細胞における FITC-albumin 取り込みは阻害された (Fig. 17)。

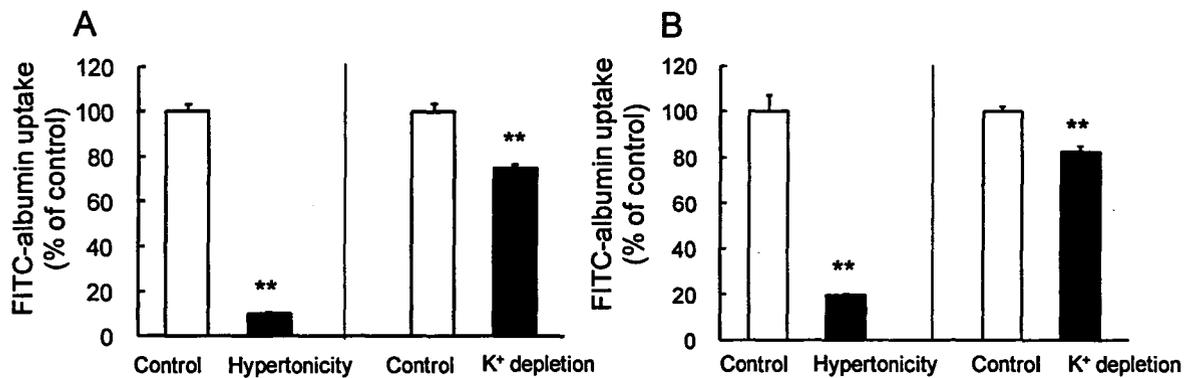


Fig. 17. Effects of hypertonicity and potassium depletion on FITC-albumin uptake by alveolar type II (A) and type I-like (B) epithelial cells.

The uptake of FITC-albumin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was measured at 37°C for 60 min. Each treatment was carried out as described in Materials and Methods. Each column represents the mean \pm SE (n = 3). ** $p < 0.01$ vs. control.

また、ラット初代培養肺胞上皮細胞に、クラスリン構成要素の1つである clathrin heavy chain の mRNA が発現しているか否か確認したところ、II 型細胞及び I 型様細胞共に mRNA 発現が認められた (Fig. 18)。

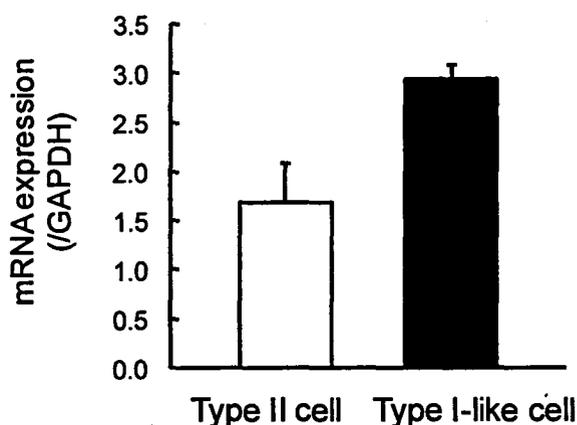


Fig. 18. The expression of clathrin heavy chain mRNA in rat alveolar epithelial cells.

Total RNA was extracted from the cells cultured for 2 (type II cell) or 6 (type I-like cell) days after seeding 5 or 2 $\times 10^6$ cells/35-mm dish, respectively. Each value represents the mean \pm SE of relative expression level normalized by *GAPDH* mRNA (n = 3).

以上の結果から、II型細胞及びI型様細胞において albumin はクラスリン介在性エンドサイトーシスにより取り込まれ、何らかのレセプターが関与することが示された。Albumin を取り込むレセプターとして、腎近位尿細管細胞においてメガリン及びキュビリンの関与が報告されており (Christensen & Birn, 2001 & 2002)、これらのレセプターは肺胞上皮 II 型細胞においても発現しているとの報告がある (Kolleck ら, 2002)。そこで RT-PCR により、本研究において確立した初代培養条件で培養した肺胞上皮 II 型細胞及び I 型様細胞においても発現しているか否か確認した。その結果、プライマーから予想される位置に (メガリン, 646 bp; キュビリン, 652 bp)、ポジティブコントロールとして用いたラット腎皮質、II 型細胞及び I 型様細胞全てにおいてメガリン及びキュビリン mRNA 由来のバンドが検出された (Fig. 19)。なお、逆転写を行わなかったサンプルに (RT(-)) についてはバンドが検出されなかったことから、検出されたバンドはゲノム DNA 由来のものではないことが確認された。

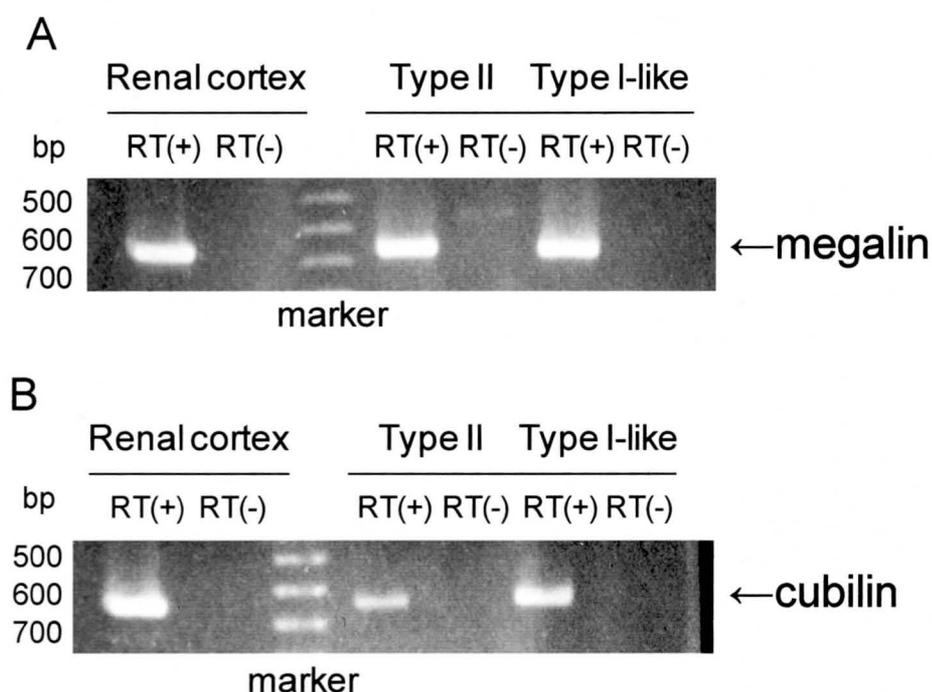


Fig. 19. The expression of megalin and cubilin mRNA in rat renal cortex and alveolar epithelial cells.

Total RNA was extracted from rat renal cortex or the cells (rat alveolar type II or type I-like cells) cultured for 2 or 6 days after seeding 5 or 2×10^6 cells/35-mm dish, respectively. The mRNA expression was analyzed by RT-PCR. The PCR products with (RT(+)) or without (RT(-)) reverse transcription were separated by electrophoresis through 2.0% agarose gels and visualized under ultraviolet light with ethidium bromide.

次に、クラスリン以外でよく知られているカベオラ介在性エンドサイトーシスの関与について解析した。阻害剤としてまず、indomethacin (IND) を用いた。IND は、カベオラの内在化と細胞膜ベシクルのリサイクリングを阻害すると言われている (Visser ら, 2004)。IND を 10 分間前処置後、FITC-albumin と共存させてインキュベーションしたところ、FITC-albumin の取り込みは両細胞において変化しなかった (Fig. 20)。さらに、他のカベオラ介在性エンドサイトーシス阻害剤である nystatin (NYS) 及び methyl- β -cyclodextrin (MCD) の影響についても検討した。NYS 及び MCD は、カベオラ形成に必要な細胞膜のコレステロールを膜から引き抜くことにより、カベオラ形成を阻害すると報告されている (Kim ら, 2007; Siczarski & Whittaker, 2002)。阻害剤処置は、IND と同様に 10 分間の前処置に加え、基質と共にインキュベーションすることにより行った。その結果、IND 及び MCD いずれも、両細胞における FITC-albumin 取り込みに対して阻害効果は認められなかった (Fig. 20)。従って、II 型細胞及び I 型様細胞における FITC-albumin 取り込みには、カベオラ介在性エンドサイトーシスは関与しないことが示された。

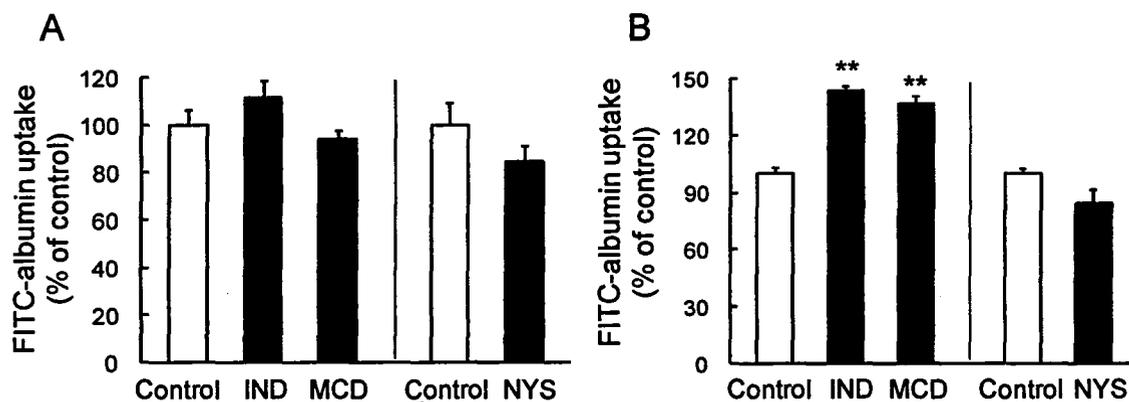


Fig. 20. Effects of inhibitors of caveolae-mediated endocytosis on FITC-albumin uptake by alveolar type II (A) and type I-like (B) epithelial cells.

The uptake of FITC-albumin (50 μ g/mL) was measured at 37°C for 60 min. Cells were treated with 100 μ M indomethacin (IND), 5 mM methyl- β -cyclodextrin (MCD), or 54 μ M nystatin (NYS) as described in Materials and Methods. Each column represents the mean \pm SE (n = 3-6). ** p < 0.01 vs. control.

第4節 II型細胞内移行後の FITC-albumin の分解消失

一般に、細胞内に取り込まれたタンパク質やペプチドは後期エンドソームを経由してリソソームへ移行し分解される経路、あるいはインタクトなままトランスサイトosisされる経路が考えられる (Gekle, 2005)。リソソームは膜に存在する ATP 依存性のプロトンポンプにより、内部は pH 5 付近に維持されており、酸性領域に至適 pH をもつ加水分解酵素が局在している。また、II 型細胞はオルガネラが発達しており、リソソームが存在している (Uhal, 1997; John ら, 2001)。一方、I 型細胞はオルガネラがほとんど存在していないと言われており、リソソームはほとんど機能していないと考えられる (Uhal, 1997)。そこで、II 型細胞内に取り込まれた FITC-albumin の分解消失について pulse-chase 解析を行った。2 日間培養した細胞に FITC-albumin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加後 60 分間インキュベーションし、FITC-albumin を含まない buffer に置換した後、さらにインキュベーションした時の細胞サンプルを用いて SDS-PAGE を行った後、ゲル中の蛍光をフルオロイメージアナライザーで検出した。

その結果、分子量約 67,000 付近にインタクトな FITC-albumin のバンド及びゲル先端に分解した FITC と思われるバンドが検出された (Fig. 21A)。また横軸に時間、縦軸に細胞内のインタクトな FITC-albumin の残存量 (% of 0 min) をとり片対数プロットした (Fig. 21B)。このプロットから、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-albumin は減少し、経時的に分解されていることが確認された。また、プロットは直線性を示したことから、細胞内から 1 次過程に従い消失することが示され ($k_e=0.0088 \text{ min}^{-1}$)、その細胞内消失半減期は約 80 分と算出された。

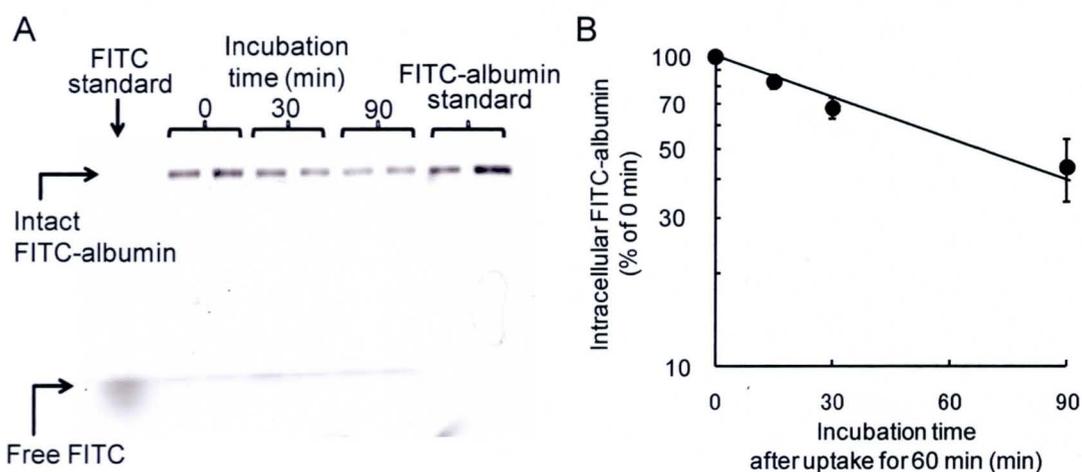


Fig. 21. Time-dependent degradation of intracellular FITC-albumin in alveolar type II cells.

A: The intactness of FITC-albumin was evaluated by fluoroimage analyzer after separation by SDS-PAGE. The data of cell samples after pulse-chase experiment described in Materials and Methods were shown. B: The fluorescence intensities of intact FITC-albumin in A were shown. The values at 0 min were set as 100%. Each point represents the mean \pm SE (n = 4-6).

第5節 肺胞上皮細胞における FITC-albumin の経細胞輸送

肺胞上皮細胞において FITC-albumin は、クラスリン介在性エンドサイトーシスによって取り込まれることが明らかになった。ラット初代培養肺胞上皮細胞において albumin は、apical 側から basal 側の方向依存的に輸送されることが報告されている (Matsukawa ら, 2000; Kim ら, 2003)。そこで、本研究で初代培養したラット肺胞上皮細胞において apical 側から basal 側へ albumin が輸送されているか否か検討した。

II 型細胞としての増殖には、fibroblast growth factor (FGF) family である KGF (FGF-7) が関与していることが知られている (MacDonald & Hill, 2002)。また、II 型細胞から I 型細胞への形質転換は、transforming growth factor β 1 (TGF β 1) によって制御されているとされている (Bhaskaran ら, 2006)。KGF は、炎症性サイトカインやステロイドホルモン等の刺激によって、繊維芽細胞及び微小血管内皮細胞から分泌され、パラクリンによって作用する (MacDonald & Hill, 2002)。一方、TGF β 1 は肺胞上皮細胞から分泌され、その分泌の程度によって II 型-I 型形質転換がオートクリンによって制御されている (Bhaskaran ら, 2006)。そこで、このような *in vivo* に近い培養条件にするために、KGF を添加した培地を用いて、単離した II 型細胞を Transwell® 上で培養し、6 日後に輸送実験に使用した。この時の膜抵抗値 (transepithelial electrical resistance; TEER) は約 $500 \Omega \cdot \text{cm}^2$ であり、報告されている TEER 値と比較して低かった (Matsukawa ら, 2000; Kim ら, 2003)。そこで本実験では、paracellular route を介して輸送される FITC-albumin を補正するために、rhodamin B isothiocyanate 標識 dextran (RITC-dextran) (~70 kDa) を用いダブルトレーサー解析を試みた。今回用いた dextran は、albumin と同程度の分子量約 70,000 のものを用いた。RITC-dextran の輸送量で補正したところ、FITC-albumin の apical から basal 方向への輸送が観察され、インキュベーション 5 時間後において basal 側へ輸送された量は、apical 側に添加した FITC-albumin の約 0.76% となった (Fig. 22)。

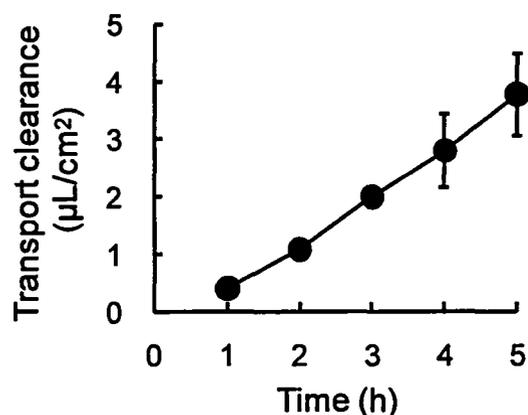


Fig. 22. Apical-to-basal transport of FITC-albumin across alveolar epithelial cell monolayers.

Cells were grown on Transwell membrane for 6 days in the presence of KGF (10 ng/mL, day2-6). The transport of FITC-albumin (0.5 mg/mL) at 37°C was normalized by the transport of RITC-dextran (70 kDa). Each point represents the mean \pm SE (n=3).

第6節 小括

前章において FITC-albumin は、II 型細胞及び I 型様細胞共に FITC-insulin、FITC-IgG 及び FITC-transferrin に比べて取り込み活性が高く、また取り込み過程には何らかの特殊な輸送システムの関与が示唆された。また、II 型細胞における取り込み活性は I 型様細胞よりも高いことが明らかになった。そこで本節では、エンドサイトーシス経路を中心に FITC-albumin の取り込み機構について、II 型細胞と I 型様細胞間で比較検討を行った。

まず第 1 節では、FITC-albumin 取り込みの基本特性を評価した。II 型細胞及び I 型様細胞共に、FITC-albumin 取り込みはインキュベーション 60 分まで時間依存的に増加した。また、取り込みには両細胞共に著しい温度依存性が認められ、このことは II 型細胞において共焦点レーザー顕微鏡観察によっても確認した。また II 型細胞を、リソソームを染色する LysoTracker red でインキュベーションしたところ、リソソームと同様に内部 pH が酸性である lamellar body も染色された (Chander ら, 1986) (data not shown)。しかし、共焦点レーザー顕微鏡で観察された lamellar body の細胞内局在は FITC-albumin の局在とは異なるものであった。このことから、II 型細胞によって取り込まれた FITC-albumin は lamellar body には移行せず、RLE-6TN 細胞で示されたように、一部リソソームに移行する可能性が考えられる (Yumoto ら, 2006)。

さらに、II 型細胞における FITC-albumin 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、少なくとも 2 種の取り込み機構の存在が示唆された。また、II 型細胞の高親和性輸送における Km 値は、培養 II 型細胞 RLE-6TN での値 (0.13 mg/mL) と同程度であった (Yumoto ら, 2006)。

そこで、高親和性輸送が 98% を占める 50 µg/mL の FITC-albumin の取り込み特性を検討した。エネルギー代謝阻害剤の影響について検討したところ、II 型及び I 型様細胞共に FITC-albumin 取り込みは有意に阻害され、エネルギー依存性が示された。

また、レセプター介在性エンドサイトーシスの関与について、vacuolar H⁺-ATPase 阻害剤である BAF を用いて検討を行ったところ、両細胞共に FITC-albumin 取り込みは有意に阻害された。また、vacuolar H⁺-ATPase の阻害によりレセプター介在性エンドサイトーシス活性が低下したことを示す報告がある (Sasaki ら, 2001; Takano ら, 2004)。以上の結果より、II 型細胞及び I 型様細胞における FITC-albumin 取り込みには、エネルギー依存的なレセプター介在性エンドサイトーシスが関与することが考えられた。この結果は、ラット初代培養肺胞上皮細胞において、albumin が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るという報告と一致するものである (Matsukawa ら, 2000; Kim ら, 2003)。次に、レセプター介在性エンドサイトーシスの中で最もよく知られているクラスリン及びカベオラ介在性エンドサイトーシスの関与について検討した。クラスリン介在性エンド

サイトーシスの阻害剤及び阻害処置を用いて検討したところ、II型細胞及びI型様細胞のいずれにおいても FITC-albumin 取り込みは減少した。従って、肺胞上皮細胞における albumin 取り込みにはクラスリン介在性エンドサイトーシスが関与していることが考えられた。また当研究室において、培養肺胞上皮 II 型細胞 RLE-6TN における FITC-albumin の取り込みにはクラスリン介在性エンドサイトーシスが関与することを報告しており、これは今回の結果を支持するものである (Yumoto ら, 2006)。

さらに、カベオラ介在性エンドサイトーシスの関与についても検討したところ、両細胞においてこの経路の阻害剤によって FITC-albumin の取り込みは阻害されなかった。今回の結果とは対照的に、ラットから初代培養した II 型細胞における albumin 取り込みには、gp60 及びカベオラが関与するとの報告がある (John ら, 2001)。しかし、第 1 章において II 型細胞は caveolin-1 の mRNA 発現が極めて低いことが確認され (Table 1)、また caveolin-1 のタンパク発現は肺胞上皮 II 型細胞において低いことが確認されている (Campbell ら, 1999)。さらに上述のように、培養肺胞上皮 II 型細胞 RLE-6TN においてクラスリン介在性エンドサイトーシスは関与するが、カベオラ介在性エンドサイトーシスは関与しないことを報告している (Yumoto ら, 2006)。従って、少なくとも II 型細胞においては、カベオラ介在性エンドサイトーシスは albumin 取り込みに関与しないと考えられた。

一方、I 型様細胞で観察された albumin の取り込みが I 型細胞自身の有する特性を反映したものであるか、それとも II 型細胞の特性が残存していることに由来するものであるかは断定出来ない。II 型細胞と I 型様細胞において albumin の取り込み機構が同様であったことから、前者の可能性が考えられるが、P-gp 機能が II 型細胞及び I 型様細胞間で異なっていた (未発表データ) ことを考え合わせると、後者の可能性も否定できない。

クラスリン介在性エンドサイトーシスに関与するレセプターの中で、albumin のエンドサイトーシスに関与するものとしてメガリンやキュビリンが知られており、これらは特に腎臓における albumin のエンドサイトーシスにおいて重要な役割を担っていることが報告されている (Christensen & Birn, 2001 & 2002)。メガリンやキュビリンの発現は、ラット初代培養肺胞上皮 II 型細胞においてタンパクレベルでの発現が確認されており (Kolleck ら, 2002)、本実験において用いた II 型細胞及び I 型様細胞においても、mRNA レベルでの発現を確認した。また、今回算出された II 型細胞における Km 値 (76 µg/mL) は、腎近位尿細管上皮細胞で求められた値 (7-20 µg/mL) と近いものであった (Gekle, 2005)。さらに、これらの値はラットから精製したキュビリンと albumin の解離定数 Kd 0.63 µM (40 µg/mL) とも近似していた (Birn ら, 2000)。さらに最近、昆虫の中腸において、albumin のエンドサイトーシスにメガリン様レセプターの関与が報告され、また albumin 取り込みの Km 値も 2 µM (133 µg/mL) と近似していた (Casartelli ら, 2008)。これらのことから可能性の 1 つと

して、メガリン及びキュービリンがII型細胞及びI型細胞における albumin の取り込みに関与することが示唆される。しかし、この仮説を支持する直接的なエビデンスは現段階では見当たらず、siRNA (small interference RNA) 等のレセプターを同定するための更なる研究が必要である。一方、当研究室の RLE-6TN 細胞における検討では、native albumin (非標識 albumin) の見かけの K_m 値は、10.6 mg/mL (158 μ M) と同細胞における FITC-albumin の高親和性輸送の K_m 値に比べて高い値を示すことを報告した (Yumoto ら, 2006)。今回の初代培養肺胞上皮細胞では native albumin の親和性については検討していないため、レセプターに関して議論するには、この点についても検討を加える必要があると考えられる。また、親和性の異なる2つの結合部位をもつ1種類のレセプターが関与しているか、親和性の異なる2種類のレセプターが関与しているかは不明であり、これに関しても更に詳細な検討を行う必要がある。

次に pulse-chase 解析により、II型細胞内に取り込まれた FITC-albumin の挙動について、SDS-PAGE/フルオロイメージアナライザーを用いて検討した。その結果、II型細胞内の FITC-albumin は経時的に分解し、その消失半減期は約 80 分と算出された。この値は、RLE-6TN 細胞において同様の検討を行った時の値とほぼ一致していた。なお、今回の検討では共焦点顕微鏡観察によってリソソームと FITC-albumin の局在は確認が出来なかったものの、RLE-6TN 細胞での場合と同様に、細胞内にエンドサイトーシスされた FITC-albumin は一部リソソームで分解を受けるものと考えられる。

さらに、肺胞腔側から細胞内に取り込まれた後、血中方向へ輸送されるか否か検討するために Transwell® を用いて検討を行った。FITC-dextran (70 kDa) の輸送量で補正することにより FITC-albumin の apical 側から basal 側への輸送を評価したところ、輸送が確認された。今回の検討では、II型細胞の維持因子として知られている KGF の存在下で培養を行った。一般的に、II型細胞及びI型細胞として評価するための Transwell® 上での培養条件としては、培地への KGF の添加の有無により培養条件を変化させて行っている報告が主流である (Widera ら, 2003; Bahady ら, 2008)。実際に、Transwell® 上に播種した II 型細胞を KGF 存在下で培養を行い、非存在下と比較して II 型細胞マーカーの発現が高く、I 型細胞マーカーの発現が低いことを示す報告がある (Borok ら, 1998a & 1998b)。しかし、KGF の有無のみでは、II 型細胞及び I 型細胞モデルを確立するには不十分である可能性がある。さらに、KGF の有無で培養した細胞において、マーカー遺伝子の発現を確認する等、細胞特性の解析も同時に行った上で輸送実験について議論している報告は見当たらない。これらのことを考慮に入れ、実験に使用した培養 6 日後における細胞は、細胞タイプを特定せず肺胞上皮細胞として用いた。従って今後の課題として、Transwell® 上に播種した II 型細胞を、強固な tight junction を形成させた状態で II 型細胞として維持する培養条件、あるいは I 型様細胞へと形質転換させるための培養条件を確立することが必要である。

第IV章 肺胞上皮細胞における insulin 輸送特性の解析

Insulin は等電点が 5.3、分子量が約 5,800 の 21 個のアミノ酸から成る A 鎖と 30 個のアミノ酸から成る B 鎖が 2 つのジスルフィド結合によりつながった構造を持つ。Insulin のように比較的分子サイズの小さいタンパク (ペプチド) の場合、細胞間隙輸送 (paracellular route) と経細胞輸送 (transcytosis) の両方の輸送経路が可能性として考えられる (Patton, 1996)。ヒト初代培養肺胞上皮 I 型様細胞を用いた検討において、insulin の見かけの透過係数は dextran と同程度であり、特殊な輸送システムは関与しないことが示唆されている (Bur ら, 2006)。一方、肺胞上皮細胞間の tight junction は、他の上皮細胞よりも強固であることが知られており (Patton, 1996)、肺胞上皮細胞において insulin の細胞間隙輸送 (paracellular route) の寄与は小さいものと推測される。さらに、ラット腎近位尿細管上皮細胞における insulin の取り込みに対して、エンドサイトーシスレセプターの 1 つであるメガリンの関与が報告されている (Orlando ら, 1998)。また、メガリンは肺胞上皮細胞においても発現が認められている (Kolleck ら, 2002)。従って、エンドサイトーシス経路が、肺胞上皮における insulin の輸送に関与することは十分に考えられる。しかしながら、肺胞上皮細胞における insulin の輸送機構に関してはほとんど情報がなく、また II 型細胞及び I 型細胞間での取り込み機構や取り込み活性の違いに関しても不明である。そこで本章では、II 型及び I 型様細胞を用いて、insulin の取り込み機構や活性について検討した。

第1節 FITC-insulin の細胞内移行の基本特性

まず、FITC-insulin 取り込みの温度依存性について検討したところ、37°Cでの見かけの取り込みに対する 4°Cでの表面結合の割合が、II 型細胞では約 60~70%、I 型様細胞では約 50~60%と高かったため (data not shown)、以降の FITC-insulin 取り込み実験においては、37°Cでの見かけの取り込み量から 4°Cでの表面結合量を差し引いた値 (取り込み量) により評価した。FITC-insulin 取り込みの時間依存性について検討したところ、II 型細胞及び I 型様細胞において、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 (Fig. 23)。次に insulin 取り込みの濃度依存性について、FITC-insulin (20 µg/mL) と非標識 insulin (0-1980 µg/mL) を共存させることにより評価した。Insulin の取り込みは、II 型細胞及び I 型様細胞共に飽和性を示し (Fig. 24)、Eadie-Hofstee plot により解析したところ各細胞における Km 値及び Vmax 値は Table 3 に示す値となった。また、II 型細胞における Km 値は I 型様細胞の値よりも小さい値を示した。

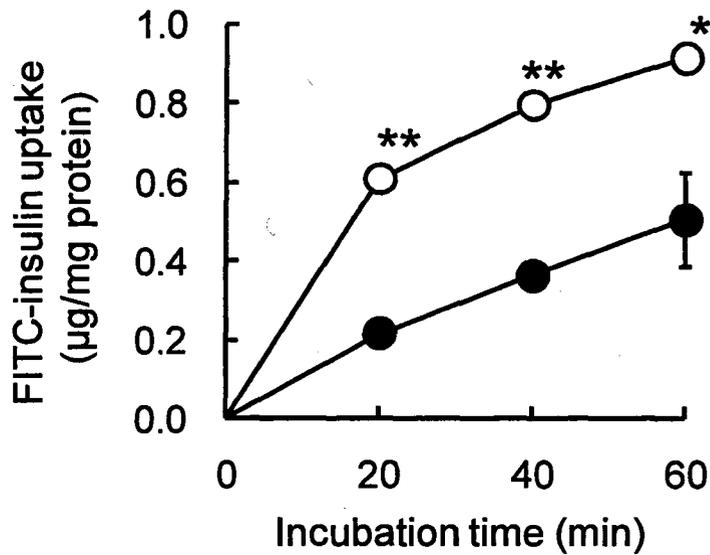


Fig. 23. Time course of FITC-insulin uptake in alveolar type II and type I-like epithelial cells.

The uptake of FITC-insulin (20 µg/mL) was estimated by subtracting cell surface binding at 4°C from total cell association at 37°C in type II (open circle) and type I-like (closed circle) cells. Each point represents the mean ± SE (n = 3). * $p < 0.05$ or ** $p < 0.01$ vs. type I-like cells.

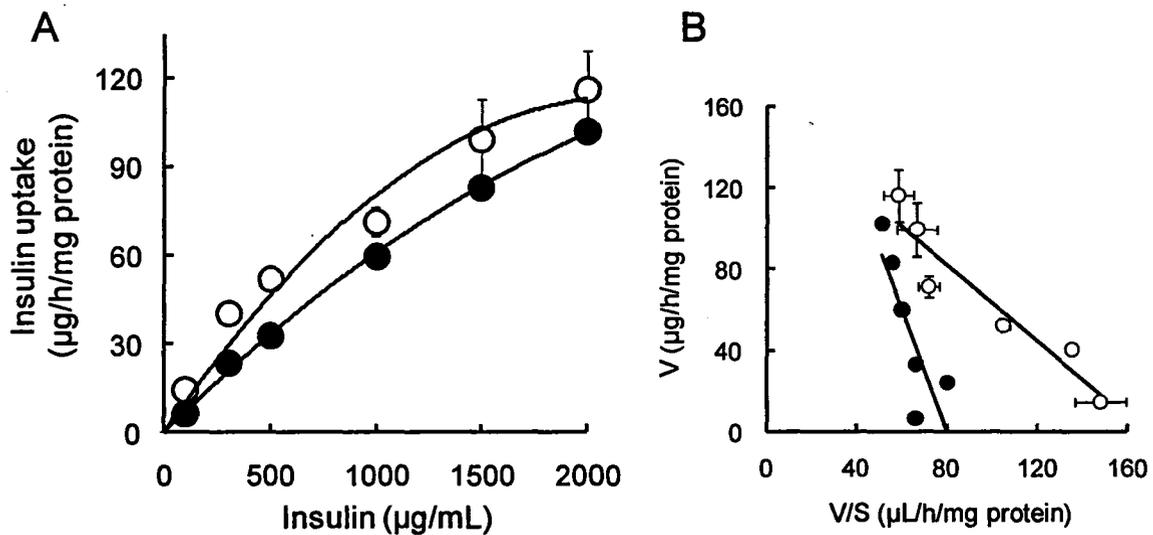


Fig. 24. Concentration-dependence of FITC-insulin uptake in alveolar type II and type I-like epithelial cells.

A: The uptake of FITC-insulin (20 µg/mL) in the absence or presence of various concentrations of unlabeled insulin for 60 min was estimated by subtracting cell surface binding at 4°C from total cell association at 37°C in type II (open circle) and type I-like (closed circle) cells. B: Eadie-Hofstee plot of the data in A. Each point represents the mean ± SE (n = 3).

Table 3. Kinetic parameters of FITC-insulin uptake by alveolar type II and type I-like cells.

	Km (mg/mL)	Vmax (μ g/h/mg protein)
Type II cell	0.944	158
Type I-like cell	3.00	240

These parameters were estimated by analyzing data (Fig. 24) using Eadie-Hofstee plot.

第2節 FITC-insulin 取り込みのエネルギー依存性

FITC-insulin の細胞内移行に及ぼすエネルギー代謝阻害剤 NaN_3 、DNP の影響、及び vacuolar H^+ -ATPase 阻害剤 BAF の影響について検討を行った。なお、各阻害の処置条件は FITC-albumin 取り込み実験と同様とした。Figure 25 に示すように、 NaN_3 及び DNP 処置により FITC-insulin 取り込みは完全に阻害された。一方 BAF 処置は、II 型細胞における FITC-insulin 取り込みしか阻害しなかった (Fig. 25)。従って、少なくとも II 型細胞においては、一部レセプター介在性エンドサイトーシスによって insulin が取り込まれている可能性が示唆された。

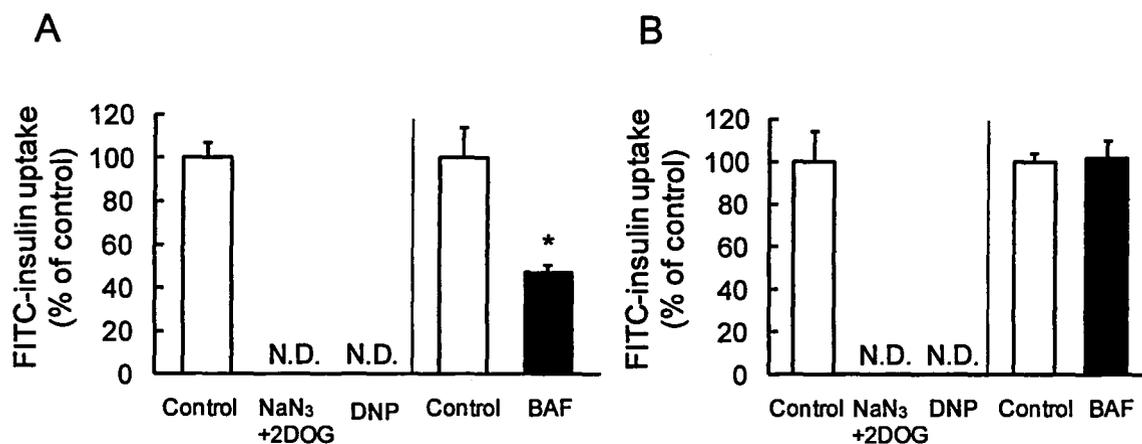


Fig. 25. Effects of metabolic inhibitors and a vacuolar H⁺-ATPase inhibitor on FITC-insulin uptake by alveolar type II (A) and type I-like (B) epithelial cells.

The uptake of FITC-insulin (20 μg/mL) for 60 min was estimated in type II and type I-like cells. Cells were treated with 10 mM sodium azide (NaN₃) plus 5 mM 2-deoxy-D-glucose (2DOG), 1 mM 2,4-dinitrophenol (DNP), or 100 nM bafilomycin A₁ (BAF). Each column represents the mean ± SE (n = 3). **p* < 0.05 vs. control. N.D., Not detected.

第3節 FITC-insulin のエンドサイトーシス機構の解析

II型細胞において、一部、レセプター介在性エンドサイトーシスが関与している可能性が示唆された。そこでまず、クラスリン介在性エンドサイトーシスの関与について検討を行った。クラスリン介在性エンドサイトーシス阻害剤であるCPZ及びPAOの影響について検討したところ、II型細胞及びI型様細胞共にFITC-insulin取り込みは阻害されなかった (Fig. 26)。なお今回検討したCPZ及びPAOの濃度は、FITC-albuminの検討において阻害効果が認められた濃度を用いた (Fig. 16)。さらに、高浸透圧及びカリウム枯渇処置の影響についても検討した結果、I型様細胞における高浸透圧処置を除いて、阻害効果は認められたものの阻害の程度はわずかであった (Fig. 27)。しかし、I型様細胞においてinsulinと同程度の分子量であるFITC-dextran (4 kDa) の取り込みに及ぼす高浸透圧処置の影響についても検討したところ、有意に阻害された (Fig. 28)。以上の結果より、クラスリン介在性エンドサイトーシスは、II型細胞及びI型様細胞におけるFITC-insulin取り込みには関与しない可能性が示された。

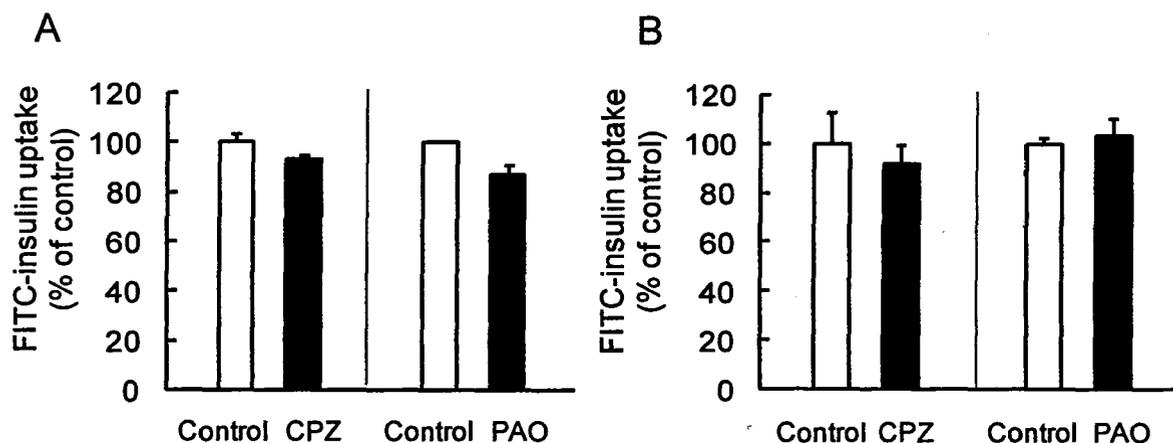


Fig. 26. Effects of inhibitors of clathrin-mediated endocytosis on FITC-insulin uptake by alveolar type II (A) and type I-like (B) epithelial cells.

The uptake of FITC-insulin (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 60 min was estimated in type II and type I-like cells. Cells were treated with 28 μM (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) chlorpromazine (CPZ) or 3 μM phenylarsine oxide (PAO). Each column represents the mean \pm SE ($n = 3$).

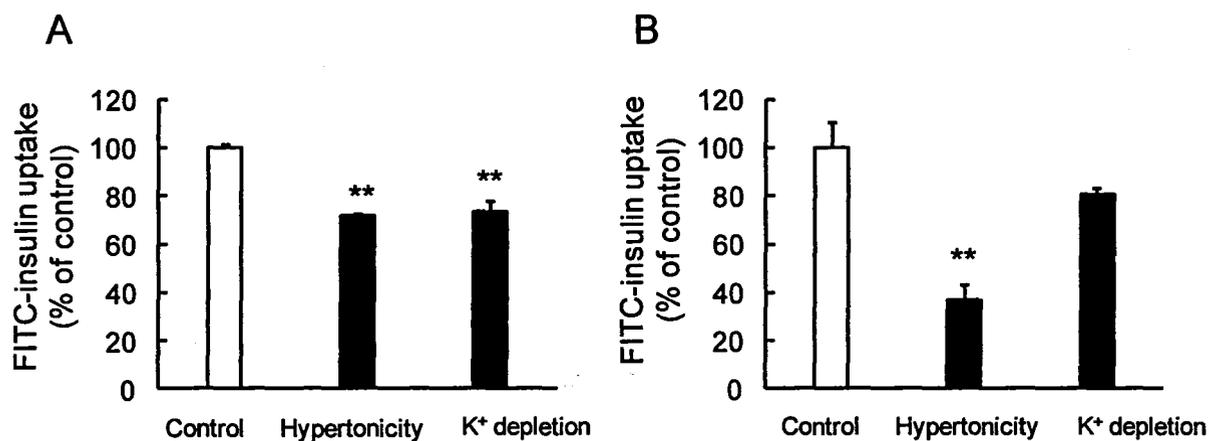


Fig. 27. Effects of hypertonicity and potassium depletion on FITC-insulin uptake by alveolar type II (A) and type I-like (B) epithelial cells.

The uptake of FITC-insulin (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 60 min was estimated in type II and type I-like cells. Each treatment was carried out as described in Materials and Methods. Each column represents the mean \pm SE ($n = 3$). ** $p < 0.01$ vs. control.

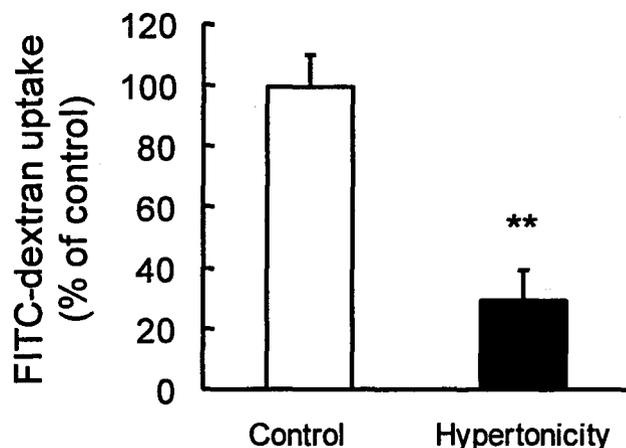


Fig. 28. Effect of hypertonicity on FITC-dextran uptake by alveolar type I-like epithelial cells.

The uptake of FITC-dextran (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 60 min was estimated in type I-like cells. Hypertonicity treatment was carried out as described in Materials and Methods. Each column represents the mean \pm SE (n = 3). ** $p < 0.01$ vs. control.

クラスリン非介在性エンドサイトーシス経路はさらに、ダイナミン依存性によって分類される (Mayor & Pagano, 2007)。ダイナミンは大分子量 GTPase の 1 つで、くびれた膜領域が小胞として摘み取られる際に作用することが知られている (Kirchhausen ら, 2008)。Dynasore はダイナミン GTPase 活性の阻害剤で、ダイナミン依存性エンドサイトーシスを阻害する (Kirchhausen ら, 2008)。そこで、FITC-insulin 取り込みに及ぼす dynasore の影響について検討することで、ダイナミンが関与しているか否か評価した。Dynasore の処置は、10 分間のプレインキュベーション後さらに FITC-insulin と共存させてインキュベーションすることにより行った。その結果、dynasore は両細胞における FITC-insulin 取り込みを阻害し、その阻害効果は II 型細胞において特に顕著であった (Fig. 29)。

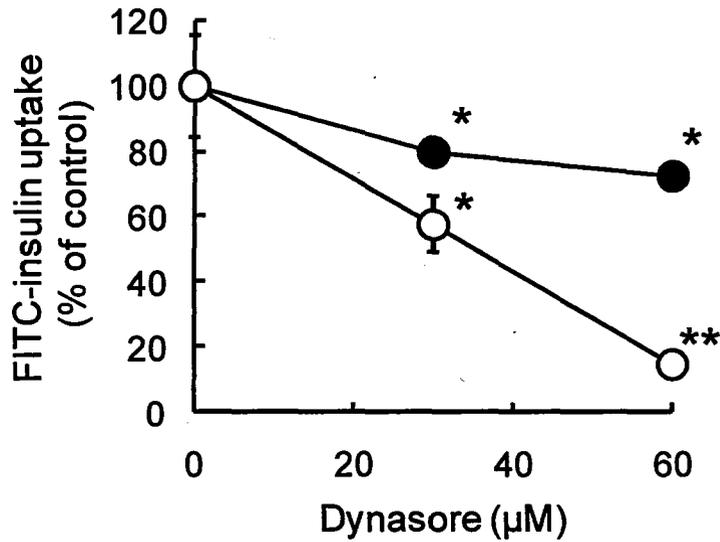


Fig. 29. Effect of dynasore on FITC-insulin uptake by type II and type I-like epithelial cells.

The uptake of FITC-insulin (20 μg/mL) for 60 min was estimated in type II (open circle) and type I-like cells (closed circle). Cells were treated with dynasore as described in Materials and methods. Each point represents the mean ± SE (n = 3). * $p < 0.05$ or ** $p < 0.01$ vs. control.

次に、クラスリン介在性以外のダイナミン依存性エンドサイトーシス経路として、カベオラ介在性エンドサイトーシスの関与について検討した。阻害剤として NYS を用いて検討したところ、II 型細胞及びI 型様細胞いずれにおいても、NYS は FITC-insulin の取り込みを阻害しなかった (Fig. 30)。

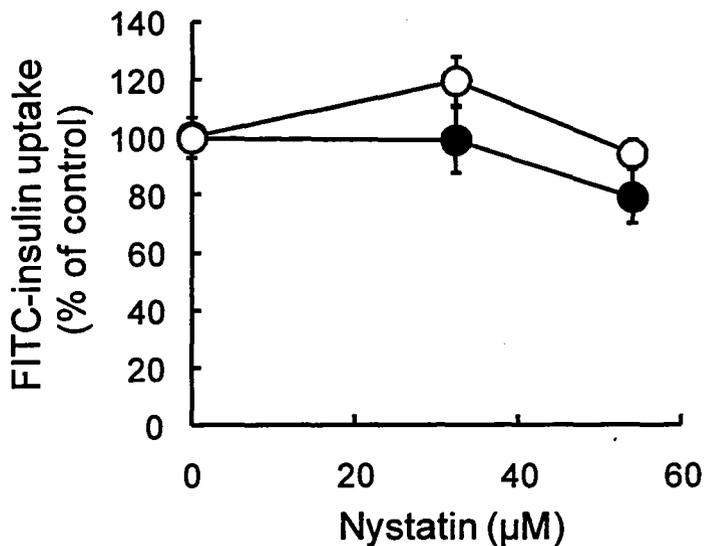


Fig. 30. Effect of nystatin on FITC-insulin uptake by type II and type I-like epithelial cells.

The uptake of FITC-insulin (20 μg/mL) for 60 min was estimated in type II (open circle) and type I-like cells (closed circle). Cells were treated with nystatin as described in Materials and methods. Each point represents the mean ± SE (n = 3).

第4節 FITC-insulin 取り込みに及ぼすタンパク質共存の影響

前節において、FITC-insulin のエンドサイトーシス経路について、II 型細胞では主にダイナミン依存性エンドサイトーシスによって、I 型様細胞では主にダイナミン非依存性のエンドサイトーシス経路によって取り込まれていることが示されたが、詳細な経路は不明である。そこで、エンドサイトーシス経路によって輸送されると考えられる代表的なタンパク質である albumin 及び lysozyme を用い、これらを共存させた時の FITC-insulin 取り込みに及ぼす影響について検討した。まず、albumin (10 mg/mL) を共存させることによって FITC-insulin の取り込みは有意に阻害され、II 型細胞ではコントロールの 17%まで、I 型様細胞では 42%まで低下した (Fig. 31)。一方、lysozyme を共存させることにより、II 型細胞における FITC-insulin 取り込みは約 22 倍亢進し、I 型様細胞における取り込みは約 1.7 倍亢進した (Fig. 31)。

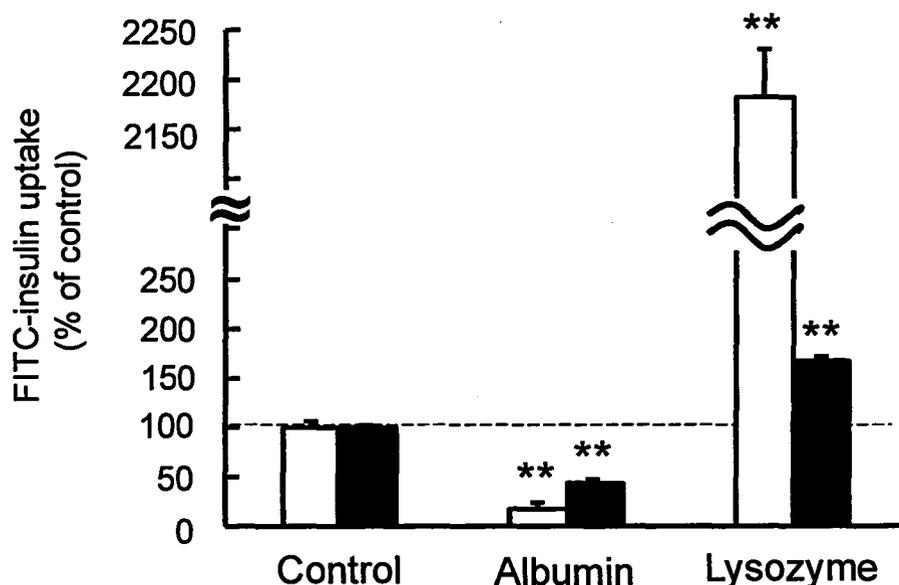


Fig. 31. Effects of albumin and lysozyme on FITC-insulin uptake by alveolar type II and type I-like cells.

The uptake of FITC-insulin (20 $\mu\text{g/mL}$) for 60 min was estimated in type II (open column) and type I-like (closed column) cells. Cells were treated with albumin (10 mg/mL) or lysozyme (10 mg/mL). Each column represents the mean \pm SE (n = 3). ** $p < 0.01$ vs. control.

第5節 肺胞上皮細胞内から血中方向への FITC-insulin の輸送

これまでに insulin の肺胞上皮における経細胞輸送について数多く報告されており、insulin は apical 方向及び basal 方向への輸送量が同等であり、I 型細胞及び II 型細胞における輸送量も同等であるとの報告がある (Bahady ら, 2007)。また、insulin の見かけの透過係数は、dextran (4 kDa) と比較してほぼ同等であるとの報告もある (Bur ら, 2006)。そのため、今回の検討では II 型細胞を Transwell® 上で培養し輸送実験前に TEER が約 $1500 \Omega \cdot \text{cm}^2$ であることを確認したものの、輸送の方向性を評価するには充分とは言い難い。そこで、細胞内に取り込まれた FITC-insulin が basal 側すなわち血中方向へ輸送されているか否かについて焦点をあて検討した。まず、FITC-insulin (50 または 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を apical 側に添加し、60 分間インキュベーションし細胞を洗浄した後、FITC-insulin を含まない buffer に置換し、さらに 60 分間インキュベーションを行った時の、細胞内に取り込まれた FITC-insulin の basal 側への輸送を評価した。その結果、細胞内に取り込まれた FITC-insulin は basal 側へ輸送されていることが示された (Fig. 32)。

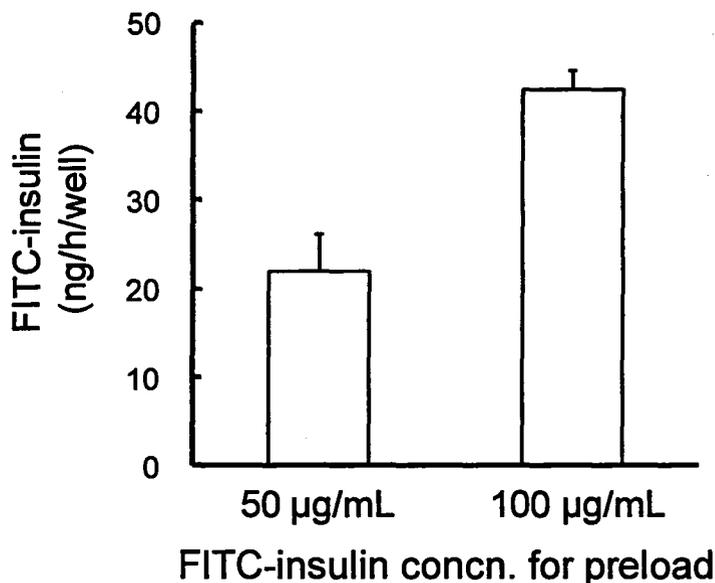


Fig. 32. Transport of FITC-insulin from intracellular compartment to the basal side across alveolar epithelial cell monolayers.

Cells were grown on Transwell membrane for 5 days in the presence of KGF (10 ng/mL , day2-5). After uptake of FITC-insulin from the apical side to the cells for 60 min at 37°C , cells were incubated with PBS-buffer in the absence of FITC-insulin for 60 min. Transport of FITC-insulin from intracellular compartment to the basal side was measured. Each point represents the mean \pm SE ($n = 3$).

第6節 小括

肺胞上皮 II 型細胞及び I 型様細胞を用いて、エンドサイトーシス経路を中心に FITC-insulin の取り込み機構について検討した。

まず第 1 節では、FITC-insulin 取り込みの基本特性を評価した。温度依存的な FITC-insulin の取り込みについて検討したところ、II 型細胞及び I 型様細胞における取り込みはインキュベーション時間の増加と共に増大した。また、エネルギー代謝阻害剤によって両細胞における FITC-insulin 取り込みは完全に阻害されたことから、エネルギー依存性が示された。さらに、両細胞において insulin 取り込みの濃度依存性について検討したところ、共に飽和性が認められた。そこでまず、vacuolar H^+ -ATPase 阻害剤 BAF の影響について検討したところ、FITC-insulin 取り込みに対する阻害効果は II 型細胞においてのみ観察された。これらの結果より、II 型細胞では一部、何らかのレセプターを介するエンドサイトーシス経路が関与し、I 型様細胞ではレセプターが関与しないエネルギー依存的な経路が関与する可能性が考えられた。

そこで II 型細胞及び I 型様細胞において、FITC-insulin 取り込みに関わるエンドサイトーシス経路について検討を行った。まず、クラスリン介在性エンドサイトーシスの関与についてその阻害剤を用いて検討したところ、II 型細胞及び I 型様細胞共に FITC-insulin 取り込みに対して阻害効果は観察されなかった。今回用いた各阻害剤の濃度は、初代培養 II 型細胞及び I 型様細胞さらには RLE-6TN 細胞における FITC-albumin 取り込みに対して阻害効果が認められた濃度である。さらに、クラスリン介在性エンドサイトーシス阻害処置である高浸透圧及びカリウム枯渇処置の影響についても検討したところ、FITC-insulin 取り込みはわずかに阻害された。ただし、高浸透圧処置は I 型様細胞における FITC-insulin 取り込みのみならず、FITC-dextran (4 kDa) の取り込みも有意に阻害した。また高浸透圧処置は、HeLa 細胞においてクラスリン介在性エンドサイトーシスに加えて、液性エンドサイトーシスマーカーの FITC-dextran の取り込みも阻害したとの報告もある (Lane ら, 2004)。そのため、高浸透圧処置はクラスリン介在性エンドサイトーシスに特異的な阻害処置とはいえないものと考えられた。これらの結果を総合的に考えると、両細胞における FITC-insulin の取り込みにはクラスリン介在性エンドサイトーシス経路は関与しない可能性が示された。

クラスリン非介在性エンドサイトーシス経路については未だ不明な点が多いが、近年、その特性や分類に関して研究が進められており、報告がいくつかなされている。エンドサイトーシス経路の分類基準としていくつかの基準が存在するが、クラスリン非介在性エンドサイトーシス経路は、ダイナミンの依存性によってさらに分類することができる (Mayor & Pagano, 2007)。ダイナミンはエンドサイトーシスにおいて、くびれた膜領域が小胞として摘み取られる際に作用することが知られ

ている。そこで、ダイナミン依存性について検討するために、ダイナミン GTPase 阻害剤である dynasore を用いて検討を行った。その結果、dynasore は II 型細胞及び I 型様細胞いずれにおいても FITC-insulin 取り込みを阻害したが、阻害効果は II 型細胞において特に顕著であった。I 型様細胞において観察された dynasore による阻害効果は、形質転換後においても残存している II 型細胞の特性である可能性も否定できない。従って、I 型様細胞における FITC-insulin 取り込みには、ダイナミン依存性エンドサイトーシス経路の関与も一部あると考えられるが、主にダイナミン非依存性のエンドサイトーシス経路が関与しているものと推察される。

次にクラスリン以外のダイナミン依存性の経路である、カベオラ依存性エンドサイトーシスについて検討した。阻害剤として NYS を用いて検討したところ、II 型細胞及び I 型様細胞における FITC-insulin 取り込みに対して阻害効果は認められなかった。従って、両細胞における insulin の取り込み過程には、カベオラ介在性エンドサイトーシスは関与しないと考えられる。

Mayor や Pagano によるエンドサイトーシス経路の分類によると、クラスリンにもカベオラにも依存しない、経路の実態が明らかになりつつある。この分類と本研究における結果に基づいて考えると、II 型細胞ではクラスリン非依存性かつカベオラ非依存性でありダイナミン依存性の経路として RhoA 調節経路が、I 型様細胞ではダイナミン非依存性の経路として CDC42 または ARF6 調節経路が関与する可能性がある (Mayor & Pagano, 2007)。肺胞上皮 II 型細胞及び I 型細胞における insulin の詳細な取り込み機構を特定するには更なる検討が必要であるが、両細胞における取り込みシステムは、albumin の場合とは対照的に細胞間で異なることが明らかになった。

II 型細胞においては、レセプター介在性エンドサイトーシスの関与が示唆された。Insulin 取り込みに関与すると考えられるレセプターとして、insulin レセプターが可能性の 1 つとして考えられる。しかし、insulin レセプターは肺胞上皮細胞の基底膜側に発現していることを示唆する報告がある (Kim & Malik, 2003; Yamahara ら, 1994)。また、今回の culture dish 上の培養条件では、insulin が基底膜側へ到達していることは考え難い。さらに、insulin レセプターの insulin に対する Kd 値は、ラット初代培養肺胞上皮細胞においては約 $2.0 \times 10^3 \mu\text{g/mL}$ と報告されている (Sugahara ら, 1984)。この値は、今回の検討で算出された Km 値 (II 型細胞, 0.944 mg/mL; I 型様細胞, 3.00 mg/mL) とは大きく異なるものである。従って、肺胞上皮細胞における insulin の取り込みには、insulin レセプターは関与しないものと考えられた。他の組織におけるレセプターに関する情報として、メガリンはラット腎近位尿管上皮細胞における insulin の取り込みに対するレセプターであるという報告がある (Orlando ら, 1998)。しかし、他にこれを支持する報告は見当たらず、肺胞上皮細胞における情報は皆無であり、メガリンの関与の有無については今後の検討が必要である。

また他の組織における insulin 取り込みに関しては、血管内皮細胞における insulin の取り込みに関

して数多く報告があり、カベオラを介した insulin の取り込み過程において、insulin レセプター及び insulin-like growth factor I receptor (IGF-IR) の関与が示唆されている (Wang ら, 2006)。また、カベオラには情報伝達系に関わるタンパク質が集合しており、カベオラの陥入に関わる cSrc-kinase の阻害や、insulin レセプターのシグナル伝達経路に関与する phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase) の阻害によって insulin の取り込みが低下することが示されている (Wang ら, 2008)。本研究の肺胞上皮細胞における insulin 取り込みには、カベオラ介在性エンドサイトーシス及び insulin レセプターは関与しないと考えられるものの、これらのシグナル伝達経路が insulin 取り込みに関与するか否かは不明であり、このような観点からの解析も必要であると考えられる。

第 III 章において、クラスリン介在性エンドサイトーシスによって取り込まれることが明らかになった albumin、及びその他のタンパク質として lysozyme (14 kDa) を用いて、FITC-insulin 取り込みに及ぼす影響について検討した。その結果、albumin は II 型細胞及び I 型様細胞における FITC-insulin 取り込みを阻害したが、逆に lysozyme は両細胞における FITC-insulin 取り込みを亢進させた。これらの結果から、albumin 及び insulin は一部共通の経路によってエンドサイトーシスされていることが示唆された。可能性のある共通の経路として、II 型細胞においては、クラスリン介在性でもカベオラ介在性でもないレセプター介在性のエンドサイトーシス経路が考えられる。その 1 つの可能性として、スカベンジャーレセプターを介したエンドサイトーシスが挙げられる。Albumin 及び insulin は生理的条件下ではアニオンとして存在しており、スカベンジャーレセプターはアニオンをリガンドとする。また変性 albumin については、スカベンジャーレセプターによってエンドサイトーシスされることが報告されている (Steinbrecher, 1999)。一方、I 型様細胞においては insulin 取り込みにレセプターは関与しないことが示唆されたため、共通の経路としては吸着性エンドサイトーシスが考えられる。また、lysozyme による FITC-insulin 取り込みの亢進作用は、カチオン性の lysozyme とアニオン性の insulin との静電的相互作用による可能性が示唆された。この例として当研究において、カチオン性ポリアミノ酸である poly-L-ornithine によって、肺胞上皮細胞における FITC-insulin の取り込みが亢進されることを明らかにしている (未発表データ)。

以上、albumin と同様に insulin の取り込み機構について検討した結果、albumin 及び insulin 間で取り込み機構が異なる結果となった。考えられる理由として、輸送されるリガンドの分子サイズや電荷の違い等が考えられるが、これらの要因のみで説明するには限界があり、物性の違いによってエンドサイトーシス経路の分類を議論することは困難であると考えられる。Albumin のエンドサイトーシス機構に関する情報を例に挙げると、腎近位尿細管上皮細胞ではメガリンを介したクラスリン介在性エンドサイトーシスによって、血管内皮細胞では gp60 を介したカベオラ介在性エンドサイトーシスによって取り込まれることから (Gekle, 2005)、同じタンパク質であっても組織によって

異なる経路で取り込まれる可能性があり、また組織によってレセプターの局在も異なるため、タンパク質の特性によって取り込み経路を分類することは容易ではない。そのため、今回得られた albumin や insulin の取り込み特性に関する知見に加え、他のタンパク質の取り込み特性についても解析することで、タンパク質とその取り込み経路に関する情報を収集することが必要である。またレセプターによって認識されるタンパク質の部位を明らかにすることで、その部位を利用した製剤設計により、より吸収性に優れた経肺投与製剤の開発への応用も期待される。

最後に、Transwell®上に培養した肺胞上皮細胞において、apical 側から細胞内に取り込まれた FITC-insulin は一部、basal 側へ輸送されていることを確認した。しかし、第 III 章でも述べたように、血中方向へのトランスサイトosis経路や輸送効率について II 型細胞及び I 型細胞間で比較解析するためには、強固な tight junction を有しかつ II 型細胞及び I 型細胞の特性を保持した初代培養細胞モデルを確立する必要がある。

結 論

以上本研究では、肺胞表面に存在する albumin 等のタンパク質のクリアランス機構、及び insulin をはじめとする経肺投与製剤の吸収機構を解明するために、ラット肺から初代培養した肺胞上皮細胞を用いて、II 型細胞から I 型細胞への形質転換と albumin あるいは insulin の輸送システムとを関連づけて解析を行った。

第 I 章 ラット肺胞上皮細胞の初代培養条件の最適化

ラットから肺胞上皮 II 型細胞を精製単離し、初代培養 II 型細胞及び I 型細胞のモデル実験系を確立した。単離した II 型細胞を 5×10^6 cells/35-mm dish (54×10^4 cells/cm²) の密度で播種し、2 日間培養した細胞は肺胞上皮 II 型細胞モデルとして、単離した II 型細胞を 2×10^6 cells/35-mm dish (22×10^4 cells/cm²) の密度で播種し、6 日間培養した細胞は肺胞上皮 I 型細胞モデルとして活用できることが、細胞形態及び II 型細胞・I 型細胞に特異的に発現しているマーカー遺伝子の mRNA 発現解析により示された。

第 II 章 肺胞上皮細胞における高分子物質のクリアランスの比較

初代培養肺胞上皮 II 型細胞及び I 型細胞モデルを用いて評価することにより、albumin 及び insulin の取り込み活性は、IgG や transferrin 等の他の高分子物質と比較し著しく高いことが明らかになった。

第 III 章 肺胞上皮細胞における albumin 輸送特性の解析 (Fig. 33)

FITC-albumin の取り込み活性について、細胞 1 個当たりの取り込み活性を算出したところ、肺胞上皮 II 型細胞の活性は I 型細胞よりも約 2.4 倍高く、肺における細胞数比を II 型細胞/I 型細胞=1.5 と仮定した場合、肺胞表面における取り込みの寄与率は II 型細胞が 4 分の 3 以上を占めることが明らかになった。また取り込み過程には、II 型細胞及び I 型細胞共にクラスリン介在性エンドサイトーシスが関与し、カベオラ介在性エンドサイトーシスは関与しないことが示された。

第IV章 肺胞上皮細胞における insulin 輸送特性の解析 (Fig. 33)

肺胞上皮 II 型細胞及び I 型細胞当たりの FITC-insulin の取り込み活性は、ほぼ同等であり、肺胞表面における取り込みの寄与について FITC-albumin の場合と同様に算出したところ、II 型細胞及び I 型細胞は同等に寄与していることが明らかになった。一方、取り込み経路は II 型細胞及び I 型細胞間で異なり、II 型細胞では主にダイナミン依存性かつクラスリン・カベオラ非依存性の経路によって、I 型細胞では主にダイナミン非依存性の経路によってエンドサイトーシスされることが示された。

以上の知見は、肺胞表面に存在する albumin 等のタンパク質のクリアランス機構の解明や、insulin をはじめとするタンパク質・ペプチド性医薬品の経肺投与製剤開発のための有用な情報になるものと考えられる。

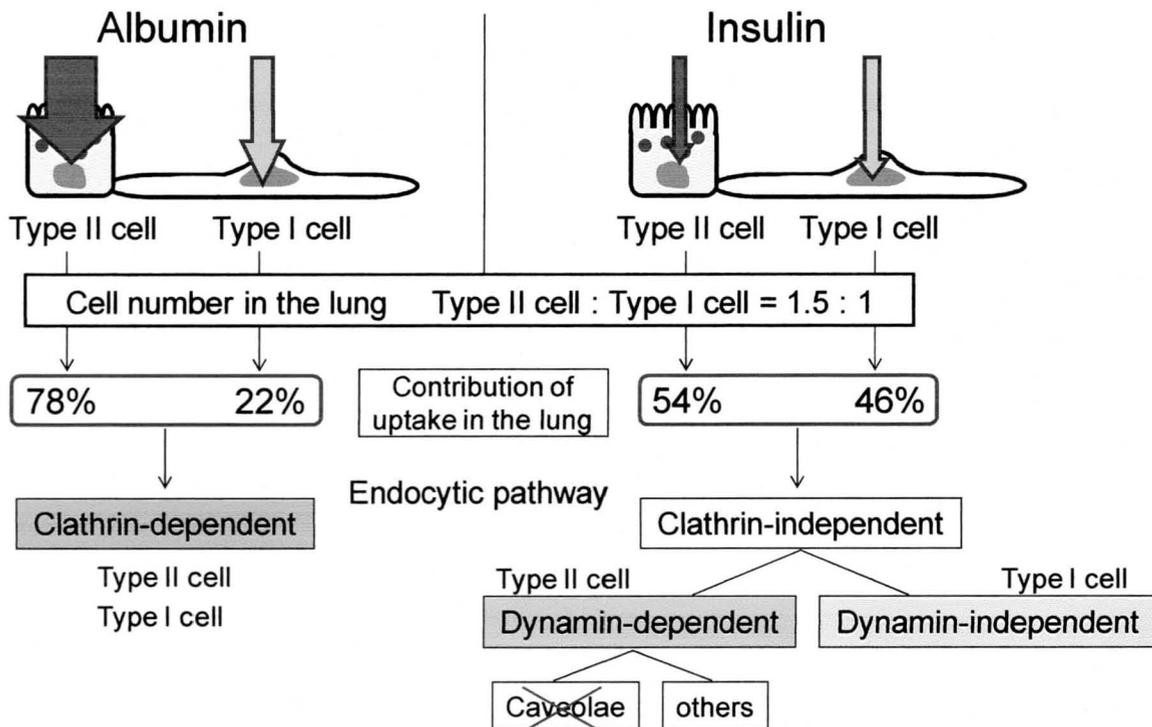


Fig. 33. The contribution of alveolar type II and type I cells to albumin and insulin internalization and their endocytic pathway.

The differences of the size among arrows reflect the differences of the uptake activity of albumin or insulin among type II or type I cells.

謝 辞

終りに臨み、本研究を行うに際し、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました広島大学大学院医歯薬学総合研究科 医療薬剤学研究室 高野 幹久 教授をはじめ、永井 純也 准教授、湯元 良子 助教に謹んで感謝の意を表します。

本論文の作成にあたり、数々の御助言、御指導を賜りました、広島大学大学院医歯薬学総合研究科 小澤 孝一郎 教授、樋木 修 教授、田原 栄俊 教授、木村 康浩 准教授に深謝致します。

本研究の遂行にあたり、お世話になりました田川 茉希 修士、小田 啓介 学士、中村 孝佑 学士、加藤 祐貴 氏をはじめ、医療薬剤学研究室諸氏、同研究室卒業生諸氏に厚く御礼申し上げます。

最後に、大学院での研究生生活を陰ながら支え、暖かく見守って下さいました家族に、心より感謝致します。

実験の部

II] 使用薬物

初代細胞培養用の試薬として用いた Dulbecco's modified Eagle medium-nutrient mixture F-12 (1:1) (DMEM/F-12)、penicillin-streptomycin、fungizone 及び trypsin (1:250, powder) は Invitrogen 社より、ウシ胎児血清 (fetal bovine serum; FBS) は第一化学より、Percoll は GE ヘルスケアバイオサイエンス社より購入した。

試薬として deoxyribonuclease I from bovine pancreas (DNase I)、fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled albumin (FITC-albumin) from bovine serum、FITC-insulin from bovine pancreas、FITC-immunoglobulin G (FITC-IgG) from human serum、FITC-transferrin from bovine、FITC-dextran (average molecular weight, 4 及び 70 kDa)、rhodamine B isothiocyanate-labeled dextran (RITC-dextran, average molecular weight ~70 kDa)、insulin from bovine pancreas、bovine serum albumin (BSA)、calf thymus DNA (Type I, fibrous)、bafilomycin A₁ (BAF)、phenylarsine oxide (PAO)、indomethacin (IND)、nystatin (NYS)、dynasore (SIGMA)、bisbenzimidazole H 33258 fluorochrome trihydrochloride (Hoechst 33258)、sodium azide (NaN₃)、2,4-dinitrophenol (DNP)、chlorpromazine (CPZ) (ナカライテスク株式会社)、2-deoxy-D-glucose (2DOG) (関東化学株式会社)、tylosin、methyl- β -cyclodextrin (MCD) (和光純薬工業株式会社)、Nucleic Acid purification kit (Mag Extractor-RNA)、RT-PCR kit (Rever Tra Dash)、SYBR[®] Green Realtime PCR Master Mix (東洋紡)、recombinant Human Keratinocyte growth Factor (KGF) (PEPROTECH) を使用した。その他の試薬は市販特級品を用いた。

III] 使用機器・器具

培養器具としてプラスチック製 35-mm culture dish、35-mm glass bottom culture dish は岩城硝子のも
のを、12-well CellBIND[®] Surface plate 及び 6-well polycarbonate membrane Transwell[®] は、Corning 社
のものを用いた。実験に使用した機器・器具としてハンドホモジナイザー：IKA ウルトラタラックス
T-8 (IKA LABORTECHNIK)、プログラムテンプコントロールシステム：mode; PC701 PC707 (ASTECH)、
電源装置：AE-8300 クロスパワー150 (150 v/3.8) (ATTO)、泳動装置：AE-6100 サブマージ アガロ
ース電気泳動装置 (SHIMADZU)、紫外可視分光光度計：UV160A (SHIMADZU)、蛍光分光光度計：
F-3000 Fluorescence Spectrophotometer Axiovert 200M (Carl ZEISS)、共焦点レーザー顕微鏡：LSM 5

Pascal (Carl ZEISS)、膜抵抗測定器 : Millicell ERS testing device (Millipore) を用いた。

Ⅲ Ⅲ ラット肺胞上皮Ⅱ型細胞の単離と初代培養

肺胞上皮Ⅱ型細胞の単離は、Specific pathogen-free Sprague-Dawley雄性ラット (体重: 120-200 g) の肺より、不連続Percoll密度勾配遠心法により行った (Richardsら, 1987)。ラットをペントバルビタール (30 mg/kg) の腹腔内投与により麻酔をかけ、頸静脈よりヘパリン (500 U/kg) を投与した。気管支切開を行い、カニューレ (o.d. 1.52 mm) を気管支に固定し、腹部大動脈及び大静脈を切断した。その後右心室より、23G針付き50 mLシリンジを用いて0.15 M NaClにより肺が完全に白くなるまで還流した。気管支のついた肺を摘出し、マクロファージを除去するために気管支カニューレより0.15 M NaCl (約10 mL) で6~7回洗浄した。0.25%トリプシン含有Solution B (133 mM NaCl, 5.2 mM KCl, 1.89 mM CaCl₂, 1.29 mM MgSO₄, 2.59 mM phosphate buffer, 10.3 mM HEPES buffer, 1 mg/mL glucose, pH 7.4) で1回洗浄した後、再度肺をトリプシン溶液で満たし、37°Cの0.15 M NaCl中で肺を吊るしながら、気管支カニューレに挿入した50 mLシリンジにトリプシン溶液を入れ、約3.3 mL/minの速度で30分間滴下した。トリプシン処理後、気管、気管支及び気道を取り除き、ろ紙上で肺の水分を除去した。ガラスシャーレ上で肺をはさみ及びチョッパーで1-2 mm³になるまでミンスした。FBS (5 mL) を加えてトリプシン反応を停止させ、250 µg/mL DNase I含有Solution A (Solution BからCaCl₂及びMgSO₄を除去した溶液) を加えて計20 mLの肺組織懸濁液とした。得られた肺組織懸濁液をプラスチック製三角フラスコに移し、37°C湯浴中130 strokes/minで4分間振盪させた。その後氷上で、懸濁液を2及び4層綿ガーゼの順でろ過し、さらに150及び15 µmナイロンメッシュの順でろ過し、細胞懸濁液を得た。この細胞懸濁液を、不連続的にPercollで比重の勾配をつけた層 (高比重層及び低比重層) の上に重層した。なお、高比重層の密度は1.089 g/mL、組成は5%FBS含有10×solution A (1 mL)、Percoll (6.49 mL) 及び蒸留水 (2.51 mL) とし、低比重層の密度は1.040 g/mL、組成は5% FBS含有10×solution A (1 mL)、Percoll (2.72 mL)、蒸留水(6.23 mL) 及びphenol red (50 µL) とした。また、低比重層のphenol redの最終濃度は、0.001% (w/v) であった。重層した調製液を4°C、250 gで25分間、スイングローターにより遠心した。高比重層及び低比重層の境界のⅡ型細胞を含有する層を回収し、50 µg/mL DNase I及び120 µg/mL tylosin含有solution Aで計40 mLとなるように懸濁した。4°C、200 gで5分間遠心し、得られた細胞を37°Cの10%FBS、100 IU/mL penicillin、100 µg/mL streptomycin及び0.25 µg/mL fungizone含有DMEM/F-12で懸濁した。得られたⅡ型細胞数は約30×10⁶ cells/ratであり、cell viabilityはトリパブルー染色により90%以上であることを確認した。細胞はCO₂インキュベーター内 (37°C、5% CO₂-95% air) で上記の培地を用いて培養し、培地交換は2日毎に行った。

実験用として、特に断りのない場合、35-mm dish及び12-well plateの場合は 54×10^4 cells/cm²で播種し2日後に、あるいは 22×10^4 cells/cm²で播種し6日後に使用した。また、多孔性フィルター上への培養は6-well Transwell®を用い、cluster側に培地2.6 mL、well側 (表面積4.7 cm²、孔径0.4 μm) には、albumin輸送実験では 100×10^4 cell/cm²の細胞密度になるように1.5 mLの細胞懸濁液を添加して培養後6日目に使用し、insulin輸送実験では 88×10^4 cell/cm²で播種後5日目に使用した。なお培養2日目以降の培地は、上記培地に10 ng/mL KGFを添加したものをを用いた。

[IV] 実験方法

1) Alkaline phosphatase 活性

単離直後のII型細胞または、II型細胞を35-mm dish上に 43×10^4 cells/cm²で播種した細胞を用いた。単離直後のII型細胞 (4×10^6 個) を遠心分離後上清を除去し0.9%NaClを加えた細胞、あるいは培養後0.9%NaClで2回洗浄しセルスクレーパーでかき取った細胞を、ハンドホモジナイザーでホモジナイズした細胞サンプルを用いた。p-nitrophenyl phosphate (18 mM) を含む50 mM glycine buffer (pH9.2) 0.5 mLに上記細胞ホモジネートを加え、37°Cで15あるいは30分間インキュベートした。0.6 M NaOH 2.5 mLで反応を停止させた後、1,700 gで10分間遠心分離し、上清の吸光度 (410 nm) を測定した。また、サンプル中のタンパク量の測定はLowry法により行った (Lowryら, 1951)。

2) RT-PCR 法

i) RNA の抽出

Nucleic Acid purification Kit : Mag-Extractor®-RNA-を用い、取扱説明書に記載されたプロトコールに従い、細胞よりtotal RNAを抽出した。

ii) RT-PCR

RT-PCR Kit : Rever Tra Dash™を用い、取扱説明書に記載されたプロトコールに従い、RT-PCRを行った。逆転写反応は、65°C 5分 (RNA高次構造の分解)、4°C 5分の後、逆転写酵素 (Rever Tra Ace™) を加え、42°C 30分 (伸長反応)、99°C 5分 (逆転写の熱変性)、4°C 5分を行った。ただし、mRNA由来のバンドであることを確認するため、逆転写酵素の代わりにDEPC処理水を加えた、逆転写反応を行わないサンプルも調製し上記反応を行った。

PCR反応はTable 4に示す条件にて行った。1サイクル目の熱変性の際に、DNA合成酵素 (KOD Dash®) を加えた (ホットスタート法)。

iii) アガロースゲル (2%) による電気泳動

アガロースゲルに TBE buffer (89 mM Tris-borate, 2 mM EDTA) を加え、ゲルを作製した。電気泳動後、buffer に ethidium bromide を 0.1 µg/mL となるように加え、40-50 分間染色した。その後、UV トランスイルミネーターを用いて増幅された DNA のバンドを観察した。

Table 4. Primer sequences and PCR conditions for RT-PCR.

Gene name	Sequence (F: forward R: reverse)	Denaturation	Annealing	Extension	cycle
<i>megalyn</i>	F 5'-ACACCGCTTCTGCCGTCT-3'	94°C (1 min)	68°C (1 min)	72°C (30 sec)	39
	R 5'-TCTGAGCACTCCCGAGGAAC-3'				
<i>cubilin</i>	F 5'-GCCTGCCCCATTTATCTCTTC-3'	94°C (1 min)	69°C (1 min)	72°C (30 sec)	35
	R 5'-CGCCGTTTCTTACCTCCAA-3'				

3) Real-time PCR 法

RNA の抽出、逆転写反応は RT-PCR 法の時と同様に行った。

PCR 反応は、SYBR Green® Realtime PCR Master Mix を用い、取扱説明書に記載されたプロトコールに従って行った。PCR 反応は、まず熱変性を 95°C 1 分行い、その後 95°C 5 秒 (熱変性) → 60°C 5 秒 (プライマーのアニーリング) → 72°C 15 秒 (伸長反応) を、40 サイクル行った。各タンパク質に対するプライマーを Table 5 に示す。PCR 反応の後、融解曲線分析を行い、非特異的産物が生成されていないことを確認した。

Table 5. Primer sequences for real-time PCR.

Gene name	Accession number	Sequence (F: forward R: reverse)	Position of amplified DNA (bp)	Product size (bp)
<i>GAPDH</i>	NM_017008	F 5'-AGCCCAGAACATCATCCCTG -3' R 5'-CACCACCTTCTTGATGTCATC -3'	676-856	181
<i>RT140</i>	U07797	F 5'-GCCATCGGTGCGCTAGAAGATGATCTT -3' R 5'-GTGATCGTGGTCGGAGGTTCTGAGGT -3'	306-500	195
<i>IGFBP6</i>	BC099742	F 5'-CCGCAGACACTTGGATTCACT -3' R 5'-TTGCTCCGCCTCTGAAGAC -3'	458-519	62
<i>mdr1a</i>	AF257746	F 5'-GATGGAATTGATAATGTGGACA -3' R 5'-GTACGTCGTCATCCAGAGT -3'	1997-2138	142
<i>caveolin-1</i>	Z46614	F 5'-CAGCATGTCTGGGGGTAAT -3' R 5'-TGCTTCTCATTACCTCGTCT -3'	25-147	123
<i>SP-B</i>	BC072466	F 5'-GCTGAGCGTTACACAGTACTTCTAC -3' R 5'-ACCAGGCCACAGACTAGCT -3'	723-796	74
<i>CINC-1</i>	D11444	F 5'-GGGTGTCCCAAGTAATGGA -3' R 5'-CAGAAGCCAGCGTTCACCA -3'	312-383	72

4) 細胞 DNA 量の測定 (Cesarone ら, 1979)

35-mm dish上で2または6日間培養した細胞を0.9%NaClで2回洗浄し、37°CのEDTA溶液 (137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, 1.1 mM D-glucose, 0.613 mM EDTA, pH 7.4) を加えセルスクレーパーでかき取った。得られた細胞懸濁液及び単離直後の既知数のII型細胞を、室温、1,000 gで10分間遠心分離した。0.9% NaClを加え、2回同条件で遠心分離することにより洗浄し、ペレットを1% SDSで溶解した。溶解した細胞溶液を0.01% SDSとなるようにSSC (standard saline citrate) buffer (154 mM NaCl, 15 mM Na₃-citrate, pH 7.0) で希釈後、21Gシリンジで懸濁した。Bisbenzimidazole H 33258 fluorochrome trihydrochloride (Hoechst 33258) in SSC buffer (0.8 µg/mL) 1 mLを細胞溶液2 mLに添加し、遮光中室温で10分間インキュベーションした。DNAと結合したHoechst 33258の蛍光を蛍光分光光度計にて、励起波長 (Excitation wavelength; Ex) 360 nm、蛍光波長 (Emission wavelength; Em) 450 nm、Band pass 10 nmで測定した。なお、calf thymus DNAを標準物質として用いた。

5) FITC 標識体の細胞内移行解析

i) 取り込み実験

実験には以下の phosphate-buffered saline (PBS) を用いた。

PBS(-) (pH 7.4) : 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄

PBS(+) (pH 7.4) : PBS(-) with 0.1 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂

PBS(G) (pH 7.4) : PBS(-) with 0.1 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, 5 mM D-Glucose

K⁺ free PBS(+) (pH 7.4) : 137 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM NaH₂PO₄, 0.1 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂

K⁺ free PBS(G) (pH 7.4) : K⁺ free PBS(+) with 5 mM D-glucose

35-mm dish または 12-well plate 上で培養した細胞を用いた。培地を除去した細胞を PBS(G) で 2 回洗浄し、37°C または 4°C の PBS(G) で 10 分間プレインキュベーションした。その後、PBS(G) を除いて基質溶液を添加し、一定時間インキュベーションした。溶液を除去した後に、氷冷した PBS(+) で 3 回洗浄した。例外として、insulin 取り込みの濃度依存性の検討では、PBS(G) または PBS(+) の代わりに K⁺ free PBS (G) または K⁺ free PBS (+) を用いた。その際、インキュベーション溶液には、非標識 insulin を含む FITC insulin (20 µg/mL) を用いた。なお、非標識 insulin 溶液の調製は、非標識 insulin を 0.1M HCl で溶解後、K⁺ free PBS(G) buffer で希釈し、溶液の pH を 0.1M NaOH で 7.4 に調整することにより行った。

取り込み実験後の細胞に氷冷 PBS(+) を加えセルスクレーパーでかき取り、4°C、9,838 g で 3 分間遠心分離後、PBS(+) を添加しもう一度同条件で遠心分離を行った。上清を取り除いた後、0.1% TritonX-100 in PBS(-) で懸濁した。ボルテックスをかけながら 30 分間放置した後、5,600 g、3 分間遠心分離を行い、上清を蛍光分光光度計にて、励起波長 (Excitation wavelength; Ex) 500 nm、蛍光波長 (Emission wavelength; Em) 520 nm、Band pass 10 nm で測定した。検量線溶液は器具への吸着を防ぐため、0.1% BSA を含む 0.1% TritonX-100 in PBS(-) を用い調製した。なお、細胞懸濁液のタンパク量は BSA を標準物質として用い、Lowry 法により定量した (Lowry ら, 1951)。

ii) 阻害剤処置

阻害剤の調製として、10 mM NaN₃、5 mM 2DOG、1 mM DNP は PBS(+) に、CPZ (28、84 µM)、IND (100 µM)、MCD (5 mM) は PBS(G) に溶解した。また、100 nM BFA は 0.1% dimethyl sulfoxide (DMSO) を含む PBS(G) に、NYS (32、54 µM)、PAO (3 µM) 及び dynasore (30、60 µM) は 0.5% DMSO を含む PBS(G) に溶解した。薬液の pH は全て 7.4 に調整した。各阻害剤は 10 分間のプレインキュベーション時より添加し、その後基質と共存させた。例外として、BAF、PAO はプレインキュベーション時のみ添加した。また、プレインキュベーションは BAF のみ 30 分間とした。

iii) クラスリン阻害処置 (Hansen ら, 1993)

実験には以下に示す buffer を使用した。

HEPES buffer (pH 7.4) (311 mOsm) : 140 mM NaCl, 10 mM KCl, 20 mM HEPES, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, and 1 mg/mL D-glucose

K⁺ free buffer (pH 7.4) (296 mOsm) : HEPES buffer without 10 mM KCl

K⁺ free hypotonic shock buffer (pH 7.4) (146 mOsm) : Mixture of K⁺ free buffer : dH₂O = 1 : 1

Hypertonic buffer (pH 7.4) (920 mOsm) : HEPES buffer with 450 mM sucrose

高浸透圧処置は、培地を除去した細胞を、HEPES buffer で 5 分間、続いて Hypertonic buffer で 10 分間プレインキュベーションした後、Hypertonic buffer で調製した基質薬液を 37°C で 60 分間インキュベーションすることにより行った。

カリウム枯渇処置は、培地を除去した細胞を、HEPES buffer → K⁺ free hypotonic shock buffer → K⁺ free buffer の順に 5 分間ずつプレインキュベーションし、その後 K⁺ free buffer で調製した基質薬液を 37°C で 60 分間インキュベーションすることにより行った。

6) 共焦点レーザー顕微鏡観察

実験には 35-mm glass bottom dish に II 型細胞を 86×10^4 cells で播種し 2 日間培養した細胞を用いた。培地を除去した細胞を PBS(G) で 2 回洗浄し、37°C または 4°C の PBS(G) で 10 分間プレインキュベーションした。その後、PBS(G) を除いて FITC-albumin (50 µg/mL) を添加し、60 分間インキュベーションした。溶液を除去した後に、氷冷した PBS(+) で 5 分間ずつ 3 回洗浄し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

7) 輸送実験

6-well Transwell® 上で培養した細胞を用いた。

i) FITC-albumin 及び RITC-dextran の輸送解析

培地を除去した細胞の apical 側及び basal 側を medium (FBS free) で 1 回洗浄後、medium (FBS free) を添加し 30 分間プレインキュベーションした。その後、medium を除いて FITC-albumin 及び RITC-dextran を共存させた溶液を apical 側 (1.5 mL) に、medium を basal 側 (2.6 mL) に添加した。インキュベーション 1、2、3、4 及び 5 時間毎に basal 側のサンプリングを行い、サンプリング直後には、サンプリングした量と同量の medium (FBS free) を添加した。なお、インキュベーションは CO₂ インキュベーター (37°C、5% CO₂-95% air) 内で行った。

サンプリングした溶液の蛍光測定は、FITC-albumin の場合、0.1% BSA を含む 0.1% Triton X-100 in

PBS(-)となるように全量 1 mL に希釈した後、蛍光分光光度計にて細胞内移行解析時と同条件で測定した。RITC-dextran の測定は、FITC の蛍光測定後のサンプル 750 μ L に pH 3.0 の酢酸酢酸アンモニウム溶液を 250 μ L 添加し、蛍光分光光度計にて、励起波長 (Excitation wavelength; Ex) 562 nm、蛍光波長 (Emission wavelength; Em) 585 nm、Band pass 20 nm で測定した。

ii) FITC-insulin の輸送解析

培地を除去した細胞の apical 側及び basal 側を PBS(G)で 1 回洗浄後、PBS(G)を添加し 30 分間プレインキュベーションした。その後、PBS(G)を除いて FITC-insulin を apical 側 (1.5 mL) に、PBS(G)を basal 側 (2.6 mL) に添加した。インキュベーション 60 分後に PBS(G)で 3 回洗浄し、PBS(G)に置換後さらにインキュベーションした。インキュベーション 60 分後に、basal 側のサンプリングを行った。FITC-insulin の蛍光測定は、FITC-albumin の場合と同様に行った。

8) インタクト FITC-albumin の検出

i) Pulse-chase 解析

II 型細胞を 54×10^4 cells/cm² で播種し 2 日間培養した細胞を用いた。培地を除去した細胞を PBS(G)で 2 回洗浄し、37°C の PBS(G)で 10 分間プレインキュベーションした。その後、PBS(G)を除いて FITC-albumin (50 μ g/mL) を添加し 60 分間インキュベーションした後、FITC-albumin を含まない PBS(G)に置換し、さらにインキュベーションを行った。インキュベーション後の細胞に氷冷 PBS(+)を加えセルスクレーパーでかき取り、4°C、9,838 g で 3 分間遠心分離後、PBS(+)を添加しもう一度同条件で遠心分離を行った。上清を取り除いた後、bromophenol blue 含有 loading buffer (2% SDS, 50 mM Tris-HCl, 10% glycerol, 6% 2-mercaptoethanol) を加え、ボルテックスで懸濁し 30 分間放置した。その後、5,600 g、3 分間遠心分離を行い、上清を -80°C で保存した。使用時には溶解後 5 分間の煮沸を行った。

ii) SDS-PAGE (SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動)

電気泳動は SDS-PAGE により行った。ポリアクリルアミドの濃度を濃縮層では 3.75%、分離層では 10% として調整し、ゲルを作製した。上記サンプルを 20 μ L ずつアプライした後、室温にて一定電流で泳動した。泳動終了後、ゲル中の蛍光を FLA-2000 にて検出した。

論文目録

本論文の基礎となる原著を以下に記す。

Ikehata M, Yumoto R, Nakamura K, Nagai J, Takano M (2008) Comparison of albumin uptake in rat alveolar type II and type I-like epithelial cells in primary culture. *Pharm. Res.* 25: 913-922.

Ikehata M, Yumoto R, Kato Y, Nagai J, Takano M. Mechanism of insulin uptake in rat alveolar type II and type I-like epithelial cells. *J. Pharm. Pharmacol.* 投稿中

参 考 文 献

- Agu RU, Ugwoke MI, Armand M, Kinget R, Verbeke N (2001) The lung as a route for systemic delivery of therapeutic proteins and peptides. *Respir. Res.* **2**: 198-209.
- Bahhady R, Kim KJ, Borok Z, Crandall ED, Shen WC (2007) Enhancement of insulin transport across primary rat alveolar epithelial cell monolayers by endogenous cellular factor(s). *Pharm. Res.* **24**: 1713-1719.
- Bahhady R, Kim KJ, Borok Z, Crandall ED, Shen WC (2008) Characterization of protein factor(s) in rat bronchoalveolar lavage fluid that enhance insulin transport via transcytosis across primary rat alveolar epithelial cell monolayers. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **69**: 808-816.
- Bhaskaran M, Kolliputi N, Wang Y, Gou D, Chintagari NR, Liu L (2007) Trans-differentiation of alveolar epithelial type II cells to type I cells involves autocrine signaling by transforming growth factor β 1 through the Smad pathway. *J. Biol. Chem.* **282**: 3968-3976.
- Birn H, Fyfe JC, Jacobsen C, Mounier F, Verroust PJ, Ørskov H, Willnow TE, Moestrup SK, Christensen EI (2000) Cubilin is an albumin binding protein important for renal tubular albumin reabsorption. *J. Clin. Invest.* **105**: 1353-1361.
- Borok Z, Danto SI, Lubman RL, Cao Y, Williams MC, Crandall ED (1998a) Modulation of T1 α expression with alveolar epithelial cell phenotype in vitro. *Am. J. Physiol.* **275**: L155-L164.
- Borok Z, Lubman RL, Danto SI, Zhang XL, Zabski SM, King LS, Lee DM, Agre P, Crandall ED (1998b) Keratinocyte growth factor modulates alveolar epithelial cell phenotype *in vitro*: expression of aquaporin 5. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **18**: 554-561.
- Bur M, Huwer H, Lehr CM, Hagen N, Guldbrandt M, Kim KJ, Ehrhardt C (2006) Assessment of transport rates of proteins and peptides across primary human alveolar epithelial cell monolayers. *Eur. J. Pharm. Sci.* **28**: 196-203.
- Campbell L, Hollins AJ, Al-Eid A, Newman GR, von Ruhland C, Gumbleton M (1999) Caveolin-1 expression and caveolae biogenesis during cell transdifferentiation in lung alveolar epithelial primary cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **262**: 744-751.

- Casartelli M, Cermenati G, Rodighiero S, Pennacchio F, Giordana B (2008) A megalin-like receptor is involved in protein endocytosis in the midgut of an insect (*Bombyx mori*, Lepidoptera). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **295**: R1290-R1300.
- Cesarone CF, Bolognesi C, Santi L (1979) Improved microfluorometric DNA determination in biological material using 33258 Hoechst. *Anal. Biochem.* **100**: 188-197.
- Chander A, Johnson RG, Reicherter J, Fisher AB (1986) Lung lamellar bodies maintain an acidic internal pH. *J. Biol. Chem.* **261**: 6126-6131.
- Cheek JM, Evans MJ, Crandall ED (1989) Type I cell-like morphology in tight alveolar epithelial monolayers. *Exp. Cell Res.* **184**:375-387.
- Chen J, Chen Z, Narasaraju T, Jin N, Liu L (2004) Isolation of highly pure alveolar epithelial type I and type II cells from rat lungs. *Lab. Invest.* **84**: 727-735.
- Christensen EI, Birn H (2001) Megalin and cubilin: synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **280**: F562-F573.
- Christensen EI, Birn H (2002) Megalin and cubilin: multifunctional endocytic receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**: 258-268.
- Conner SD, Schmid SL (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature.* **422**: 37-44.
- Dobbs LG (1990) Isolation and culture of alveolar type II cells. *Am. J. Physiol.* **258**: L134-L147.
- Downs TR, Wilfinger WW (1983) Fluorometric quantification of DNA in cells and tissue. *Anal. Biochem.* **131**: 538-547.
- Edelson JD, Shannon JM, Mason RJ (1988) Alkaline phosphatase: a marker of alveolar type II cell differentiation. *Am. Rev. Respir. Dis.* **138**: 1268-1275.
- Forbes B (2002) Pulmonary epithelial cell culture. *Methods Mol. Biol.* **188**: 65-75.
- Frederiksen B, Pressler T, Hansen A, Koch C, Høiby N (2006) Effect of aerosolized rhDNase (Pulmozyme®) on pulmonary colonization in patients with cystic fibrosis. *Acta. Paediatr.* **95**: 1070-1074.
- Galan BE, Simsek S, Tack CJ, Heine RJ (2006) Efficacy and safety of inhaled insulin in the treatment of diabetes mellitus. *Neth. J. Med.* **64**: 319-325.

- Gekle M (2005) Renal tubule albumin transport. *Annu. Rev. Physiol.* **67**: 573-594.
- Gonzalez R, Yang YH, Griffin C, Allen L, Tigue Z, Dobbs L (2005) Freshly isolated rat alveolar type I cells, type II cells, and cultured type II cells have distinct molecular phenotypes. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **288**: L179-L189.
- Guntur VP, Dhand R (2007) Inhaled insulin: extending the horizons of inhalation therapy. *Respir. Care.* **52**: 911-922.
- Hamilton JG (1995) Needle phobia: a neglected diagnosis. *J. Fam. Pract.* **41**: 169-175.
- Hankins J (2006) The role of albumin in fluid and electrolyte balance. *J. Infus. Nurs.* **29**: 260-265.
- Hansen SH, Sandvig K, van Deurs B (1993) Clathrin and HA2 adaptors: effects of potassium depletion, hypertonic medium, and cytosol acidification. *J. Cell Biol.* **121**: 61-72.
- Hastings RH, Folkesson HG, Matthay MA (2004) Mechanisms of alveolar protein clearance in the intact lung. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **286**: L679-L689.
- Hussain A, Arnold JJ, Khan MA, Ahsan F (2004) Absorption enhancers in pulmonary protein delivery. *J. Control. Release.* **94**: 15-24.
- John TA, Vogel SM, Minshall RD, Ridge K, Tiruppathi C, Malik AB (2001) Evidence for the role of alveolar epithelial gp60 in active transalveolar albumin transport in the rat lung. *J. Physiol.* **533**: 547-559.
- Kim KJ, Malik AB (2003) Protein transport across the lung epithelial barrier. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **284**: L247-L259.
- Kim KJ, Matsukawa Y, Yamahara H, Kalra VK, Lee VH, Crandall ED (2003) Absorption of intact albumin across rat alveolar epithelial cell monolayers. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **284**: L458-L465.
- Kim HR, Gil S, Andrieux K, Nicolas V, Appel M, Chacun H, Desmaële D, Taran F, Georgin D, Couvreur P (2007) Low-density lipoprotein receptor-mediated endocytosis of PEGylated nanoparticles in rat brain endothelial cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**: 356-364.
- Kirchhausen T, Macia E, Pelish HE (2008) Use of dynasore, the small molecule inhibitor of dynamin, in the regulation of endocytosis. *Methods Enzymol.* **438**: 77-93.

- Kolleck I, Wissel H, Guthmann F, Schlame M, Sinha P, Rüstow B (2002) HDL-holoparticle uptake by alveolar type II cells: effect of vitamin E status. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **27**: 57-63.
- Lane C, Petris MJ, Benmerah A, Greenough M, Camakaris J (2004) Studies on endocytic mechanisms of the Menkes copper-translocating P-type ATPase (ATP7A; MNK). Endocytosis of the Menkes protein. *Biometals.* **17**: 87-98.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- MacDonald KP, Hill GR (2002) Keratinocyte growth factor (KGF) in hematology and oncology. *Curr. Pharm. Des.* **8**: 395-403.
- Mastrandrea LD, Quattrin T (2006) Clinical evaluation of inhaled insulin. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **58**: 1061-1075.
- Mathias NR, Yamashita F, Lee VH (1996) Respiratory epithelial cell culture models for evaluation of ion and drug transport. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **22**: 215-249.
- Matsukawa Y, Yamahara H, Yamashita F, Lee VH, Crandall ED, Kim KJ (2000) Rates of protein transport across rat alveolar epithelial cell monolayers. *J. Drug Target.* **7**: 335-342.
- Mayor S, Pagano RE (2007) Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**: 603-612.
- McElroy MC, Kasper M (2004) The use of alveolar epithelial type I cell-selective markers to investigate lung injury and repair. *Eur. Respir. J.* **24**: 664-673.
- Nelson N, Harvey WR (1999) Vacuolar and plasma membrane proton-adenosinetriphosphatases. *Physiol. Rev.* **79**: 361-385.
- Ochs M, Nyengaard JR, Jung A, Knudsen L, Voigt M, Wahlers T, Richter J, Gundersen HJ (2004) The number of alveoli in the human lung. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **169**: 120-124.
- Orlando RA, Rader K, Authier F, Yamazaki H, Posner BI, Bergeron JJM, Farquhar MG (1998) Megalin is an endocytic receptor for insulin. *J. Am. Soc. Nephrol.* **9**: 1759-1766.
- Owens DR, Zinman B, Bollit G (2003) Alternative routes of insulin delivery. *Diabet. Med.* **20**: 886-898.

- Patton JS (1996) Mechanisms of macromolecule absorption by the lungs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **19**:3-36.
- Patton JS (2000) Pulmonary delivery of drugs for bone disorders. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **42**: 239-248.
- Patton JS, Byron PR (2007) Inhaling medicines: delivering drugs to the body through the lungs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**: 67-74.
- Reynolds LJ, McElroy M, Richards RJ (1999) Density and substrata are important in lung type II cell transdifferentiation in vitro. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **31**: 951-960.
- Richards RJ, Davies N, Atkins J, Oreffo VIC (1987) Isolation, biochemical characterization, and culture of lung type II cells of the rat. *Lung.* **165**:143-158.
- Rückert P, Bates SR, Fisher AB (2003) Role of clathrin- and actin-dependent endocytotic pathways in lung phospholipid uptake. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **284**: L981-L989.
- Sakagami M (2006) In vivo, in vitro and ex vivo models to assess pulmonary absorption and disposition of inhaled therapeutics for systemic delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **58**: 1030-1060.
- Sasaki Y, Nagai J, Kitahara Y, Takai N, Murakami T, Takano M (2001) Expression of chloride channel, ClC-5, and its role in receptor-mediated endocytosis of albumin in OK cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **282**: 212-218.
- Scheuch G, Kohlhaeufel MJ, Brand P, Siekmeier R (2006) Clinical perspectives on pulmonary systemic and macromolecular delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **58**: 996-1008.
- Sieczkarski SB, Whittaker GR (2002) Dissecting virus entry via endocytosis. *J. Gen. Virol.* **83**: 1535-1545.
- Steimer A, Haltner E, Lehr CM (2005) Cell culture models of the respiratory tract relevant to pulmonary drug delivery. *J. Aerosol Med.* **18**:137-182.
- Steinbrecher UP (1999) Receptors for oxidized low density lipoprotein. *Biochim. Biophys. Acta.* **1436**: 279-298.
- Sugahara K, Freidenberg GR, Mason RJ (1984) Insulin binding and effects on glucose and transepithelial transport by alveolar type II cells. *Am. J. Physiol.* **247**: C472-C477.
- Takano M, Koyama Y, Nishikawa H, Murakami T, Yumoto R (2004) Segment-selective absorption of lysozyme in the intestine. *Eur. J. Pharmacol.* **502**: 149-155.

- Uhal BD (1997) Cell cycle kinetics in the alveolar epithelium. *Am. J. Physiol.* **272**: L1031-L1045.
- Visser CC, Stevanovic S, Heleen Voorwinden L, Gaillard PJ, Crommelin DJ, Danhof M, De Boer AG (2004) Validation of the transferrin receptor for drug targeting to brain capillary endothelial cells in vitro. *J. Drug Target.* **12**: 145-150.
- Wang H, Liu Z, Li G, Barrett EJ (2006) The vascular endothelial cell mediates insulin transport into skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **291**: E323-E332.
- Wang H, Wang AX, Liu Z, Barrett EJ (2008) Insulin signaling stimulates insulin transport by bovine aortic endothelial cells. *Diabetes.* **57**: 540-547.
- Wang J, Edeen K, Manzer R, Chang Y, Wang S, Chen X, Funk CJ, Cosgrove GP, Fang X, Mason RJ (2007) Differentiated human alveolar epithelial cells and reversibility of their phenotype *in vitro*. *Am J. Respir. Cell Mol. Biol.* **36**: 661-668.
- Wang LH, Rothberg KG, Anderson RG (1993) Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J. Cell Biol.* **123**: 1107-1117.
- Warburton D, Bellusci S (2004) The molecular genetics of lung morphogenesis and injury repair. *Paediatr. Respir. Rev.* **5**: S283-S287.
- Ware LB, Matthay MA (2000) The acute respiratory distress syndrome. *N. Engl. J. Med.* **342**: 1334-1349.
- Widera A, Kim KJ, Crandall ED, Shen WC (2003) Transcytosis of GCSF-transferrin across rat alveolar epithelial cell monolayers. *Pharm. Res.* **20**: 1231-1238.
- Williams MC (2003) Alveolar type I cells: molecular phenotype and development. *Annu. Rev. Physiol.* **65**: 669-695.
- Yamahara H, Lehr CM, Lee VH, Kim KJ (1994) Fate of insulin during transit across rat alveolar epithelial cell monolayers. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **40**: 294-298.
- Yumoto R, Nishikawa H, Okamoto M, Katayama H, Nagai J, Takano M (2006) Clathrin-mediated endocytosis of FITC-albumin in alveolar type II epithelial cell line RLE-6TN. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **290**: L946-L955.