

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02586

研究課題名(和文) 薬剤性肺線維症の原因、バイオマーカーおよび治療標的としてのマイクロRNA

研究課題名(英文) MicroRNA as a cause, a biomarker, and a therapeutic target of pulmonary fibrosis

研究代表者

高野 幹久 (Takano, Mikihisa)

広島大学・医系科学研究科(薬)・教授

研究者番号：20211336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：薬剤性肺線維症は抗がん剤など多様な薬剤によって引き起こされるが、現在、その機構解明は遅れている。本研究では、薬剤性肺線維症とマイクロRNA(miRNA)の関係性について明らかにすることを目的に検討を行った。肺胞上皮型細胞の特性を持つA549/ABCA3細胞、マウスやラットの肺線維症モデル動物を用い、肺障害性薬物(ブレオマイシン、メトトレキサートなど)の影響について解析した。その結果、miR-34aおよびmiR-222は、薬剤誘発性肺線維症の原因でありバイオマーカーあるいは治療標的として、miR-484はバイオマーカーとして有用である可能性を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬剤性肺障害は、臨床で大きな問題であり、例えば肺線維症では5年後の死亡率が約50%にも上る。肺線維症の発症には、筋線維芽細胞による過剰な細胞外マトリックスの産生が関与するが、筋線維芽細胞の由来として、肺胞上皮型細胞の筋線維芽細胞への転換(上皮間葉転換; EMT)が注目されている。本研究において我々は、肺障害性薬物による型細胞のEMT誘発とマイクロRNA(miRNA)の関係について解析し、EMTや線維化の原因、あるいはバイオマーカー、防御標的となるmiRNAを見出すことができた。これらの知見は、薬剤誘発性肺線維症の早期発見法や防御法を開発する上で有用な基礎的知見になると考える。

研究成果の概要(英文)：Drug-induced pulmonary fibrosis is caused by various drugs such as anticancer drugs, but the elucidation of its mechanism is currently delayed. The purpose of this study was to clarify the relationship between drug-induced pulmonary fibrosis and microRNA(miRNA). The effects of drugs (bleomycin, methotrexate, etc.) were analyzed using A549/ABCA3 cells having the characteristics of alveolar type II epithelial cells and pulmonary fibrosis model animals of mice and rats. As a result, it was found that miR-34a and miR-222 may be a cause of fibrosis and useful as a biomarker or therapeutic target of drug-induced pulmonary fibrosis, while miR-484 may be useful as a biomarker.

研究分野：薬学

キーワード：薬剤性肺線維症 肺胞上皮細胞 上皮間葉転換 マイクロRNA バイオマーカー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

薬剤性肺障害(間質性肺炎や肺線維症)は、臨床上大きな問題であり、例えば肺線維症では5年後の死亡率が約50%にも上る。薬剤性肺線維症は抗がん剤など多様な薬剤によって引き起こされるが、現在、その機構解明は遅れている。また、肺線維症への対処として、ステロイド投与などが行われるが、その効果は十分ではない。肺線維症は、筋線維芽細胞による過剰な細胞外マトリックスの産生に起因するが、近年、筋線維芽細胞の由来として、肺胞上皮II型細胞の筋線維芽細胞への転換(上皮間葉転換(Epithelial-mesenchymal transition; EMT))が注目されている。我々はこれまで、肺胞上皮II型細胞に対する肺障害性薬物(ブレオマイシン(BLM)、メトトレキサート(MTX)など)の影響について検討を行い、これら薬剤がEMTを引き起こすことを明らかにしてきた。その過程で、薬剤処置による肺胞上皮細胞の形質変化にある種のマイクロRNA(miRNA)が関与することを示唆する知見を得た。薬剤性臓器障害とmiRNAの関係性について、比較的研究が行われているのは、薬剤による心毒性、肝毒性、および腎毒性の領域である。しかし、肺胞上皮における薬剤誘発性EMTとmiRNAの関係については、極めて情報が乏しい。

miRNAは20~25塩基長の短いノンコーディングRNAであり、mRNAと結合して翻訳過程を阻害、あるいはmRNAを不安定化することにより、様々な機能タンパク質の発現を抑制している。ヒトでは約2000のmiRNAが同定されており、またmiRNAとmRNAの相互作用は、多対多の関係にあるため、極めて複雑な制御機構を構成している。薬剤誘発性肺線維症におけるmiRNAの役割に焦点を当てて解析することで、新たな観点からの薬剤性肺線維症誘発メカニズムの理解、肺線維症の予測・早期発見、そして予防・治療につながることを期待される。

### 2. 研究の目的

本研究では、薬剤性肺線維症とmiRNAの関係性について明らかにすることを目的とする。すなわち、薬剤処置による肺胞上皮II型細胞のmiRNAの発現変化とEMT誘発の関係性、EMTと関連するmiRNA(EMT関連miRNA)の発現変化の普遍性(異なる薬剤間での共通性など)、EMT関連miRNAの肺線維症バイオマーカーとしての有用性、さらには薬剤性肺障害の予防・治療の標的としてのEMT関連miRNAの可能性について検討することを目的とする。

### 3. 研究の方法

A549/ABCA3細胞の樹立: A549細胞はヒト由来であり肺胞上皮II型細胞のモデルとして汎用されているが、II型細胞に特有の細胞内オルガネラであるlamellar bodyが未発達であるなど必ずしもII型の形質を保持していない点もある。そこでA549細胞にlamellar bodyの膜上に存在し、lamellar bodyの形成や肺サーファクタントの産生に必要なABCA3(リン脂質トランスポーター)の遺伝子をレトロウイルスベクターによって導入し、ABCA3を安定的に発現するA549/ABCA3細胞を樹立した。

共焦点レーザー顕微鏡観察: 細胞内のlamellar bodyをLysoTracker® Redで、核をHoechst 33342で染色した後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

薬物処置: A549/ABCA3細胞をBLM、MTX、ゲフィチニブ(GEF)、パクリタキセル(PTX)あるいは代表的なEMT誘発因子であるTransforming growth factor(TGF)-β1で一定時間処理した。

mRNAおよびmiRNAの発現解析: 肺胞上皮細胞あるいは肺組織からtotal RNAを抽出後、逆転写反応によってcDNAを調製し、real-time PCR法を用いてmRNAあるいはmiRNAの発現量を定量した。

miRNAのマイクロアレイ解析: 肺胞上皮細胞からmiRNAを抽出し、TORAYの3D-Gene® Human miRNA Oligo chipを用いて解析した。

タンパク質の発現解析: タンパク質の発現はWestern Blot法により解析した。

miRNAのmimicあるいはinhibitorの細胞内導入: 肺胞上皮細胞内への導入は、Lipofectamine™ 2000を用いリポフェクション法により行った。

肺線維症モデル動物の作出: マウス(Slc DDDY雄性マウス)およびラット(Sprague-Dawley雄性ラット)にそれぞれ5 mg/kgおよび15 mg/kgのBLMを経口気管内投与法により単回経肺投与した。コントロール群には同容量の生理食塩水を投与した。一定期間経過後、肺を単離し、Hydroxyproline Assay Kitを用いてヒドロキシプロリン量を定量し、肺線維症の指標とした。

### 4. 研究成果

#### 1) A549/ABCA3細胞の樹立:

ヒト由来の培養肺胞上皮細胞A549細胞からRNAを抽出し、ABCA3遺伝子を2つのフラグメントに分けてRT-PCR法により増幅し全長をクローニングした。この遺伝子をレトロウイルスベクター(pMXs-Puro Retroviral Vector)に組み込み、最終的にPlat-E細胞から放出されたウイルスを用いてA549細胞にABCA3遺伝子を導入し、A549/ABCA3細胞を得た。A549/ABCA3細胞ではABCA3のmRNAが著しく上昇し、遺伝子導入がうまく行われていることが示された(Fig. 1A)。また、II型細胞、I型細胞からなる肺胞上皮細胞において、II型細胞にのみ発現している

プチドトランスポーター-PEPT2 の mRNA 発現も A549/ABCA3 細胞において上昇していた (Fig. 1A)。さらに A549/ABCA3 細胞ではII型細胞に特有の細胞内オルガネラである lamellar body の形成も亢進していた (Fig. 1B)。従って、ABCA3 遺伝子の導入によって、A549 細胞のII型形質が少なくとも部分的には高まったものと考えられた。

## 2) 肺障害性薬物による A549/ABCA3 細胞の EMT の誘発:

A549/ABCA3 細胞を肺障害性薬物である BLM、MTX で処置したところ、細胞の形態が敷石状から間葉系細胞様に変化するとともに、アクチンフィラメントのリモデリングが生じることも確認された (data not shown)。また BLM、MTX 処置によって間葉系細胞 (筋線維芽細胞) のマーカーである  $\alpha$ -Smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) mRNA の発現上昇、上皮系細胞 (II型細胞) のマーカーである ABCA3 mRNA の発現低下が観察された (Fig. 2)。また  $\alpha$ -SMA mRNA の発現上昇は、BLM や MTX と同様に、GEF および PTX 処置によっても認められた (Fig. 2)。従って、A549/ABCA3 細胞においては、幅広い肺障害性薬物 (抗がん剤) によって EMT が誘発されるものと考えられた。

## 3) マイクロアレイを用いた BLM および MTX 処置細胞の miRNA 発現の網羅的解析:

A549/ABCA3 細胞を BLM、MTX で処置し、miRNA の発現に対する影響を、マイクロアレイを用いて網羅的に解析した (Fig. 3)。その結果、BLM および MTX 処置の両者において有意に2倍以上発現上昇する miRNA が8種類、有意に1/2以下に発現が低下する miRNA が10種類抽出された。

## 4) 肺障害性薬物による miR-34a の発現変動:

上記マイクロアレイ解析において、2倍以上発現上昇する miRNA に miR-34a が含まれていた。我々は以前、ラット正常肺由来培養細胞 RLE-6TN のII型形質を ABCA3 遺伝子導入で高めた RLE/Abca3 細胞を用い、BLM や MTX 処置によって miR-34a の発現が増加することを報告している。そこでさらに A549/ABCA3 細胞を用い、miR-34a の発現に及ぼす肺障害性薬物の影響について real-time PCR 法を用いて解析した。その結果、BLM、MTX、GEF および PTX のいずれの薬物によっても、miR-34a の発現上昇が確認された (Fig. 4)。従って、miR-34a の発現上昇は、複数の肺障害性薬物 (抗がん剤) および複数の細胞種で共通して認められる普遍性の高い現象と考えられた。

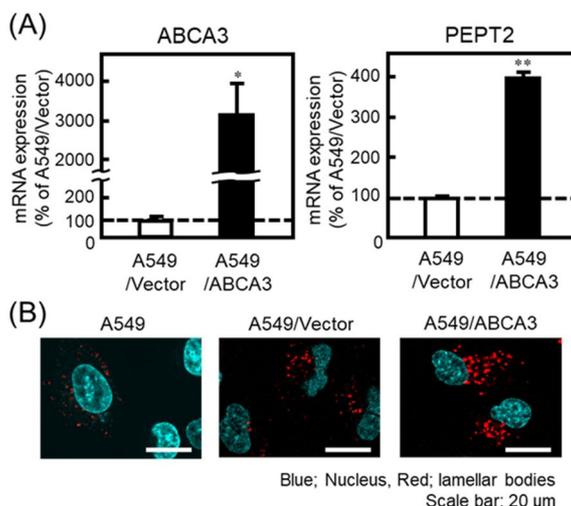


Fig. 1. (A) A549 細胞への ABCA3 遺伝子導入による ABCA3 および PEPT2 の mRNA 発現への影響 (Mean  $\pm$  S.E.M. (n=3). \*p<0.05, \*\*p<0.01 vs A549/Vector) (B) ABCA3 遺伝子導入による lamellar body 形成への影響 (赤色: lamellar body、青色: 核)

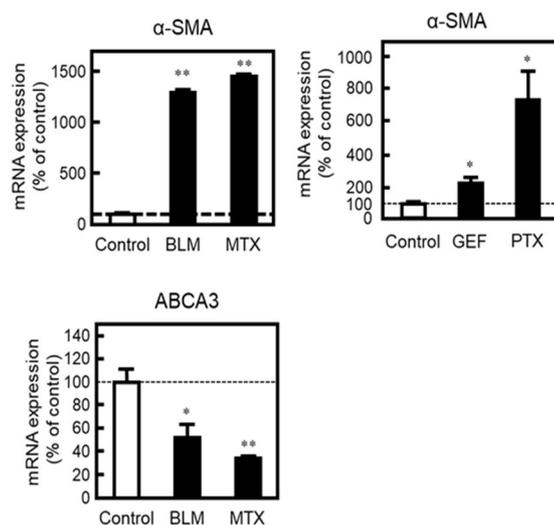


Fig. 2. A549/ABCA3 細胞における  $\alpha$ -Smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) および ABCA3 の mRNA 発現に及ぼす肺障害性薬物の影響 (ブレオマイシン (BLM)、メトトレキサート (MTX)、ゲフィチニブ (GEF)、パクリタキセル (PTX)) (Mean  $\pm$  S.E.M. (n=3). \*p<0.05, \*\*p<0.01 vs Control)

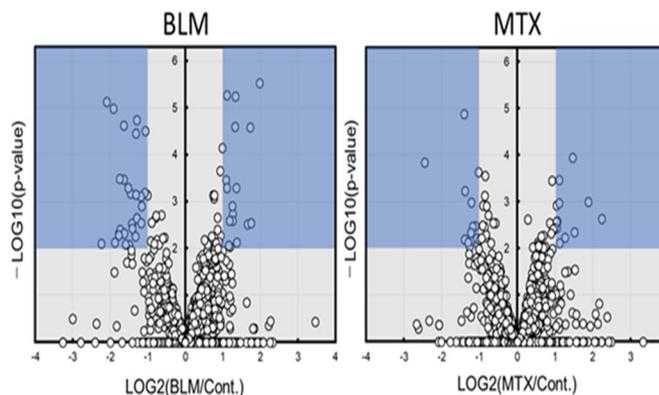


Fig. 3. マイクロアレイを用いた BLM および MTX 処置細胞における miRNA 発現の網羅的解析 (Volcano plot) 青色掛けの部分はコントロールに対して2倍以上あるいは1/2以下の発現変化を示し、かつ p<0.01 の miRNA を含む領域

### 5) A549/ABCA3 細胞への miR-34a mimic 導入による EMT の誘発:

肺障害性薬物によって A549/ABCA3 細胞の miR-34a が上昇することが明らかになったため、次に miR-34a の上昇と EMT の関係について検討した。すなわち、A549/ABCA3 細胞に miR-34a mimic を導入することで、EMT が誘発されるかどうか検討した。その結果、miR-34a mimic の導入により、間葉系マーカーである  $\alpha$ -SMA、COL1A1 (コラーゲン) および Fibronectin の mRNA 発現が上昇した (Fig. 5)。従って、miR-34a の上昇は、A549/ABCA3 細胞の EMT、ひいては肺の線維化に直接関与する可能性が示唆された。

### 6) 肺障害性薬物による miR-34 上昇のメカニズム:

これまでの検討で肺障害性薬物によって肺胞上皮細胞の miR-34a が上昇し、それによって EMT が誘発される可能性が示唆された。そこで肺障害性薬物による miR-34 上昇のメカニズムについて検討した。まずマイクロアレイによって得られたデータの中で、BLM および MTX 処置によって発現が有意に 2 倍以上に、あるいは 1/2 以下に変動する計 18 種類の miRNA の標的を TargetScan で検索した。その結果、重複を除いて計 860 個の遺伝子がこれらの miRNA が標的とする可能性のある遺伝子として抽出された。そこでこれら遺伝子が関与する pathway について Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) の Pathway データベースを用いて解析を行ったところ、p53 signaling pathway の p 値が最も低く、それら標的遺伝子セットと関与する可能性の高い pathway として示された。そこで、BLM や MTX 処置によって p53 の活性化 (リン酸化) が起こるかどうか A549/ABCA3 細胞を用いて検討した。その結果、BLM および MTX 処置によって核画分中の p53 のリン酸化 (Ser15 のリン酸化) 体が増加することが明らかとなった (Fig. 6)。リン酸化された p53 は核内へ移行し、miR-34a の転写を活性化することが報告されている。従って、肺障害性薬物は p53/miR-34a 経路を介して EMT を誘発する可能性が示唆された。

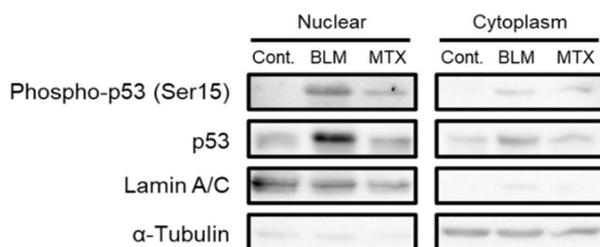


Fig.6. A549/ABCA3 細胞における BLM および MTX 処置による p53 の活性化 (Ser15 のリン酸化) Lamin A/C (核のマーカー)、 $\alpha$ -Tubulin (細胞質のマーカー)

### 7) 肺線維症モデルマウスの作成と EMT:

ヒドロキシプロリンはコラーゲンに含まれる主要なアミノ酸であり、線維化の指標として汎用されている。そこでマウスに BLM を気管内投与し、14 日後、21 日後に肺組織中のヒドロキシプロリン含量を測定した。その結果、肺組織中のヒドロキシプロリンは、14 日後には増加傾向、21 日後には有意な増加が認められた (Fig. 7)。また  $\alpha$ -SMA の mRNA は 14 日後に有意に上昇し、miR34a も増加傾向が認められた (data not shown)。従って、BLM 投与 21 日後には肺線維症が生じるが、それに先立って 14 日後には EMT が起こり、その一部に miR34a が関与する可能性が示唆された。

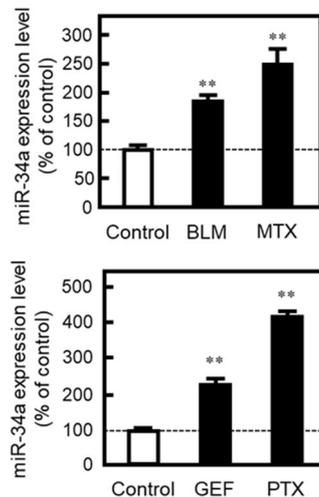


Fig. 4. A549/ABCA3 細胞における miR-34a の発現に及ぼす肺障害性薬物の影響  
プレオマイシン (BLM)、メトトレキサート (MTX)、ゲフィチニブ (GEF)、パクリタキセル (PTX)  
Mean  $\pm$  S.E.M. (n=3). \*\*p<0.01 vs Control

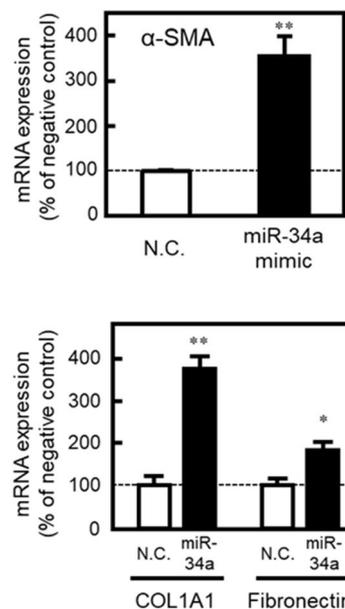


Fig. 5. A549/ABCA3 細胞への miR-34a mimic 導入による EMT の誘発  
 $\alpha$ -SMA、COL1A1 (コラーゲン)、Fibronectin の mRNA 発現に及ぼす miR-34a mimic 導入の影響  
Mean  $\pm$  S.E.M. (n=3). \*p<0.05, \*\*p<0.01 vs N.C. (negative control)

## 8) 肺線維症モデルマウスにおける miR-484 の発現変化:

上記3)の A549/ABCA3 細胞を用いたマイクロアレイ解析において、BLM および MTX 処置によって有意に 1/2 以下に発現が低下する miRNA の一つとして miR-484 が同定された。そこで BLM 誘発性の肺線維症モデルマウス (BLM 投与 21 日後) を用い肺組織中の miR-484 発現を解析した。その結果、肺組織中の miR-484 発現はコントロールマウスと比べて有意に低下していた。さらに、同マウスの血漿中の miR-484 も低下していた (Fig. 8)。一方、miR-484 inhibitor で A549/ABCA3 細胞内の miR-484 を低下させても EMT の誘発は認められなかった (data not shown)。従って、miR-484 の低下は BLM 誘発性 EMT の直接的な原因ではないが、バイオマーカーとして活用できる可能性が示唆された。

## 9) 肺線維症モデルラットの EMT と miR-222:

上記検討ではマウス肺線維症モデルを用いたが、肺胞上皮II型細胞内での変化を解析するには必要量のII型細胞を単離できるラットの方が適している。そこでラットに BLM を気管内投与し肺線維症モデルを作成した。BLM 投与ラットでは、投与 7 日後では変化は見られなかったものの、投与 14 日後にコラーゲンの成分であるヒドロキシプロリンの肺組織中含量が有意に増加しており線維症の発症が確認された (Fig. 9)。一方、BLM 投与 7 日後のラットから単離した肺胞上皮II型細胞において、II型細胞 (上皮系細胞) マーカーである Abca3、SP-C、Ecad の mRNA 発現の低下、間葉系マーカーである  $\alpha$ -SMA、Col1a1 の mRNA 発現の増加が観察され (Fig. 10)、マウスの場合と同様に、肺の線維化に先立って EMT が起こっているものと考えられた。そこで EMT 関連 miRNA として新たに miR-222 に着目し検討を進めた。miR-222 は、以前我々がラット由来の RLE/Abca3 細胞を用い、TGF- $\beta$ 1 や BLM、MTX によってその発現が上昇することを認めている miRNA である。その結果、BLM 投与 7 日後のラットの肺組織、肺胞上皮II型細胞、血漿、気管支肺胞洗浄液 (BALF) において miR-222 が上昇することが明らかになった (data not shown)。さらに A549/ABCA3 細胞に miR-222 mimic を導入したところ、 $\alpha$ -SMA タンパク質の発現増加が認められた (data not shown)。従って、miR-222 は BLM 誘発性肺線維症の原因、バイオマーカーおよび治療標的となり得る可能性が示唆された。

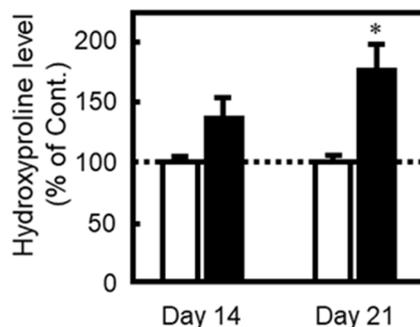


Fig. 7. BLM 投与マウスの肺組織におけるヒドロキシプロリン含量  
コントロールマウス: 白カラム、BLM 投与マウス: 黒カラム  
Mean  $\pm$  S.E.M. (n=3~4). \*p<0.05 vs Control mouse

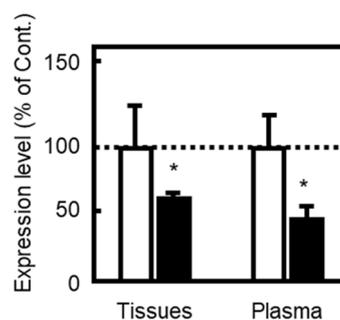


Fig. 8. BLM 投与マウスの肺組織中および血漿中の miR-484  
コントロールマウス: 白カラム、BLM 投与マウス: 黒カラム  
Mean  $\pm$  S.E.M. (n=3~4). \*p<0.05 vs Control mouse

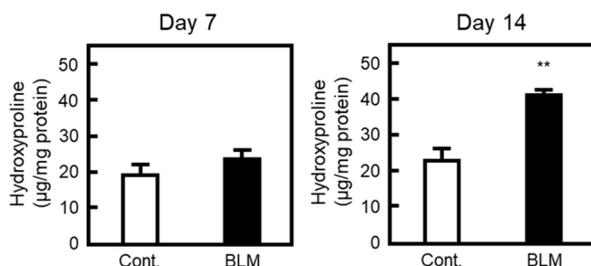


Fig. 9. BLM 投与ラットの肺組織におけるヒドロキシプロリン含量  
Mean  $\pm$  S.E.M. (n=3). \*\*p<0.01 vs Control rats

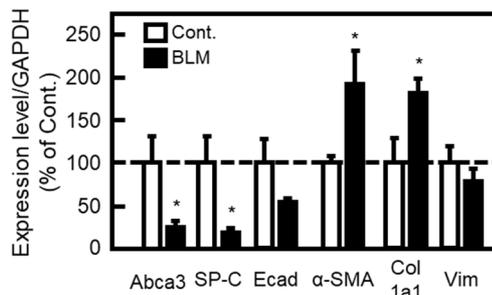


Fig.10. BLM 投与ラットから単離した肺胞上皮II型細胞中の各種 mRNA 発現  
II型細胞 (上皮系細胞) マーカー: Abca3, SP-C, E-cadherin (Ecad)  
間葉系マーカー:  $\alpha$ -SMA, Col1a1, vimentin (Vim)  
Mean  $\pm$  S.E.M. (n=3). \*p<0.05 vs Control rat

以上の結果から、miR-34a および miR-222 は、薬剤誘発性肺線維症の原因、バイオマーカーあるいは治療標的として、miR-484 はバイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。これらの知見は、臨床現場で頻発している重篤な副作用である薬剤誘発性肺線維症の早期発見法や防御法を開発する上で有用な基礎的知見になると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計19件（うち査読付論文 19件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kawami, M., Takenaka, S., Kadekaru, Y., Akai, M., Konaka, T., Yumoto, R. and Takano, M.	4. 巻 461
2. 論文標題 Evaluation on epithelial-mesenchymal state and microRNAs focusing on isolated alveolar epithelial cells from bleomycin injured rat lung	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Toxicology	6. 最初と最後の頁 152903
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tox.2021.152903	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ojima, T., Kawami, M., Yumoto, R. and Takano, M.	4. 巻 37
2. 論文標題 Differential mechanisms underlying methotrexate-induced cell death and epithelial-mesenchymal transition in A549 cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Toxicological Research	6. 最初と最後の頁 293-300
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s43188-020-00067-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawami, M., Takenaka, S., Akai, M., Yumoto, R. and Takano, M.	4. 巻 11
2. 論文標題 Characterization of mir-34a-induced epithelial-mesenchymal transition in non-small lung cancer cells focusing on p53	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 1853
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biom11121853	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Baba, S., Yumoto, R., Kawami, M. and Takano, M.	4. 巻 76
2. 論文標題 Functional expression of equilibrative and concentrative nucleoside transporters in alveolar epithelial cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmazie	6. 最初と最後の頁 416-421
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1691/ph.2021.1017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shintani, Y., Kato, K., Kawami, M., Takano, M. and Kumamoto, T.	4. 巻 69
2. 論文標題 Direct N1-selective alkylation of hydantoins using potassium bases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chem. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 407-410
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c20-00857	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Konaka, T., Kawami, M., Yamamoto, A., Yumoto, R., Takano, M.	4. 巻 23
2. 論文標題 miR-484: A possible indicator for drug-induced pulmonary fibrosis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Pharm Pharm Sci.	6. 最初と最後の頁 486-495
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18433/jpps31448	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takano, M., Deguchi, J., Senoo, S., Izumi, M., Kawami, M., Yumoto, R.	4. 巻 75
2. 論文標題 Suppressive effect of quercetin against bleomycin-induced epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Drug Metab Pharmacokinet.	6. 最初と最後の頁 329-334
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dmpk.2020.08.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamagami, Y., Kawami, M., Ojima, T., Futatsugi, S., Yumoto, R., Takano, M.	4. 巻 525
2. 論文標題 Role of plasminogen activator inhibitor-1 in methotrexate-induced epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial A549 cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 543-548
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.02.131	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takano, M., Higashi, M., Baba, S., Kawami, M., Yumoto, R.	4. 巻 75
2. 論文標題 Transport of ribavirin in human myelogenous leukemia cell line K562	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pharmazie	6. 最初と最後の頁 329-334
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1691/ph.2020.0440	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uddin, M., Kawami, M., Yumoto, R., Takano, M.	4. 巻 393
2. 論文標題 Effect of transforming growth factor- 1 on functional expression of monocarboxylate transporter 1 in alveolar epithelial A549 cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 889-896
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00210-019-01802-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto, A., Kawami, M., Konaka, T., Takenaka, S., Yumoto, R., Takano, M	4. 巻 22
2. 論文標題 Anticancer drug-induced epithelial-mesenchymal transition via p53/miR-34a axis in A549/ABCA3 cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Pharm Pharm Sci	6. 最初と最後の頁 516-524
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18433/jpps30660	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawami, M., Harada, R., Ojima, T., Yamagami, Y., Yumoto, R., Takano, M.	4. 巻 424
2. 論文標題 Association of cell cycle arrest with anticancer frug-induced epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Toxicology	6. 最初と最後の頁 152231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tox.2019.06.002.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawami, M., Honda, N., Hara, T., Yumoto, R., Takano, M.	4. 巻 34
2. 論文標題 Investigation on inhibitory effect of folic acid on methotrexate-induced epithelial-mesenchymal transition focusing on dihydrofolate reductase.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Pharmacokinetics	6. 最初と最後の頁 396-399
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dmpk.2019.08.003.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawami, M., Honda, N., Miyamoto, M., Yumoto, R., Takano, M.	4. 巻 71
2. 論文標題 Reduced folate carrier-mediated methotrexate transport in human distal lung epithelial NCI-H441 cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Pharm Pharmacol,	6. 最初と最後の頁 167-175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jphp.13022.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takano, M., Takeuchi, T., Kuriyama, S., Yumoto, R.	4. 巻 229
2. 論文標題 Role of peptide transporter 2 and MAPK signaling pathways in the innate immune response induced by bacterial peptides in alveolar epithelial cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Life Sciences	6. 最初と最後の頁 173-179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lfs.2019.05.042.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawami, M., Harabayashi, R., Harada, R., Yamagami, R., Yumoto, R. and Takano, M.	4. 巻 497
2. 論文標題 Folic acid prevents methotrexate-induced epithelial-mesenchymal transition via suppression of secreted factors from the human alveolar epithelial cell line A549	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 457-463
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.02.111	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawami, M., Shimonakamura, T., Yumoto, R. and Takano, M.	4. 巻 21
2. 論文標題 Transport of AOPP-albumin into human alveolar epithelial A549 cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Pharm. Pharm. Sci.	6. 最初と最後の頁 247-255
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18433/jpps29905	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawami, M., Yamada, Y., Issarachot, O., Junyaprasert, V.B., Yumoto, R. and Takano, M.	4. 巻 73
2. 論文標題 P-gp modulating effect of Azadirachta indica extract in multidrug-resistant cancer cell lines	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pharmazie	6. 最初と最後の頁 104-109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1691/ph.2018.7116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Takano, M., Higashi, M., Ito, H., Toyota, S., Hirabayashi, Y. and Yumoto, R.	4. 巻 73
2. 論文標題 Functional expression of breast cancer resistance protein and cholesterol effect in human erythrocyte membranes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pharmazie	6. 最初と最後の頁 700-705
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1691/ph.2018.8724	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計45件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 16件）

1. 発表者名 赤井美月、竹中慎之介、川見昌史、湯元良子、高野幹久
2. 発表標題 p53に着目した非小細胞肺癌細胞株におけるmiR-34a誘発性上皮間葉転換
3. 学会等名 日本薬学会第142年会（名古屋）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川見昌史、湯元良子、高野幹久
2. 発表標題 抗がん剤による抗がん効果および上皮間葉転換におけるp53の役割解析
3. 学会等名 日本薬学会第142年会（名古屋）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹内 裕孝、泉 美穂、川見 昌2、湯元 良子、高野 幹久
2. 発表標題 肺胞上皮細胞の形質に及ぼす高濃度グルコースの影響解析
3. 学会等名 日本薬学会第142年会（名古屋）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高野 幹久
2. 発表標題 肺胞上皮細胞における高分子および低分子物質の輸送とその制御
3. 学会等名 第12回粉末吸入剤研究会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kawami, M., Kawabata, K., Yumoto, R., Nishi, H., Tokumura, A., Takano, M.
2. 発表標題 Effect of 2-deoxy-D-glucose on transforming growth factor- 1-induced epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelium
3. 学会等名 36nd JSSX Annual Meeting in Takasaki（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kameda, N., Kuriyama, S., Kawami, M., Yumoto, R., Takano, M.
2. 発表標題 Mechanism of the inhibitory effect of inhaled corticosteroids on peptide transporter 2
3. 学会等名 36nd JSSX Annual Meeting in Takasaki (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 赤井美月、竹中慎之介、川見昌史、湯元良子、高野幹久
2. 発表標題 ヒト肺胞上皮A549/ABCA3細胞におけるmiR-34aによる上皮間葉転換機構の解明
3. 学会等名 第60回日本薬学会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉盛智世、二木空人、湯元良子、川見昌史、高野幹久
2. 発表標題 肺胞上皮細胞A549におけるアベマシクリブ誘発性上皮間葉転換機構の解明
3. 学会等名 第60回日本薬学会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹内裕孝、泉美穂、川見昌史、湯元良子、高野幹久
2. 発表標題 ヒト肺胞上皮細胞の上皮間葉転換に対する終末糖化産物および高濃度グルコースの影響
3. 学会等名 第60回日本薬学会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福島愛梨、馬場しずく、川見昌史、湯元良子、高野幹久
2. 発表標題 ラット初代培養肺胞上皮細胞におけるヌクレオシドトランスポーターの発現・機能解析
3. 学会等名 日本膜学会第43年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 嘉手刈佑史、小中崇史、竹中慎之介、赤井美月、川見昌史、湯元良子、高野幹久
2. 発表標題 薬剤性肺障害に対するバイオマーカーの探索を指向した肺障害モデルラットにおけるmiRNAの変動解析
3. 学会等名 日本薬剤学会第36年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本多未来一、原拓也、湯元良子、川見昌史、高野幹久
2. 発表標題 肺胞上皮細胞の上皮系および間葉系形質に及ぼすNrf2の影響解析
3. 学会等名 日本薬剤学会第36年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川見昌史、湯元良子、高野幹久
2. 発表標題 肺胞上皮におけるTGF- $\beta$ 1誘発性上皮間葉転換と糖代謝の関連解析
3. 学会等名 日本薬剤学会第36年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹中慎之介、川見昌史、湯元良子、高野幹久
2. 発表標題 ヒト肺胞上皮におけるmiR-34aによる上皮間葉転換誘発機構の解明
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本多未来一、川見昌史、湯元良子、高野幹久
2. 発表標題 肺胞上皮におけるメトトレキサート誘発性上皮間葉転換とNrf2の関連解析
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 泉美穂、妹尾俊祐、湯元良子、高野幹久
2. 発表標題 高濃度グルコースおよび終末糖化産物による肺胞上皮細胞の上皮間葉転換の誘発
3. 学会等名 日本薬剤学会第36年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Miho Izumi, Shunsuke Senoo, Masashi Kawami, Ryoko Yumoto, Mikihisa Takano
2. 発表標題 Role of high glucose and advanced glycation end products in inducing epithelial-mesenchymal-transition in alveolar epithelial cells
3. 学会等名 35th JSSX Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sorahito Futatsugi, Ryoko Yumoto, Masashi Kawami, Mikihisa Takano
2. 発表標題 Relationship between abemaciclib-induced cytotoxicity and epithelial-mesenchymal transition in a549 cells
3. 学会等名 35th JSSX Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 普久原梨沙、小島崇路、湯元良子、川見昌史、高野幹久
2. 発表標題 メトトレキサート誘発性上皮間葉転換におけるITGA2の関与
3. 学会等名 第59回日本薬学会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川見昌史、湯元良子、高野幹久
2. 発表標題 肺胞上皮におけるオーファントランスポーターRhCGと上皮間葉転換の関連解析
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryoko Yumoto, Ayano Yamamoto, Takashi Konaka, Shinnosuke Takenaka, Masashi Kawami, Mikihisa Takano
2. 発表標題 Role of microRNAs in drug-induced epithelial-mesenchymal transition in human lung-derived alveolar type II epithelial cell model A549/ABCA3.
3. 学会等名 12th International ISSX Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小中崇史、山本彩乃、竹中慎之介、川見昌史、湯元良子、高野幹久
2. 発表標題 肺障害性薬物によるヒト肺胞上皮II型細胞モデルA549/ABCA3の上皮間葉転換とmiRNAの関連解析
3. 学会等名 日本薬剤学会第35年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ayano Yamamoto, Masashi Kawami, Takashi Konaka, Shinnosuke Takenaka, Ryoko Yumoto, Mikihisa Takano
2. 発表標題 Role of miR-34a/p53 axis in drug-induced epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells.
3. 学会等名 第13回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Konaka, Ayano Yamamoto, Shinnosuke Takenaka, Masashi Kawami, Ryoko Yumoto, Mikihisa Takano
2. 発表標題 In vitro and In vivo study on association of miR-484 with drug-induced epithelial-mesenchymal transition
3. 学会等名 第13回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹中慎之介、山本彩乃、川見昌史、湯元良子、高野幹久
2. 発表標題 新規肺胞上皮細胞モデルを用いた肺障害性薬物による上皮間葉転換とmiR-34aの関連解析
3. 学会等名 第58回日本薬学会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川見昌史、山上洋平、妹尾俊祐、湯元良子、高野幹久
2. 発表標題 肺胞上皮細胞における薬物誘発性上皮間葉転換を抑制する化合物の探索とその特性解析
3. 学会等名 日本薬剤学会第35年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川見昌史、山上洋平、湯元良子、高野幹久
2. 発表標題 メトトレキサート誘発性上皮間葉転換に及ぼすPAI-1の影響解析
3. 学会等名 第11回日本RNAi研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yohei Yamagami, Sorahito Futatsugi, Ryoko Yumoto, Masashi Kawami, Mikihisa Takano
2. 発表標題 Role of plasminogen activator inhibitor-1 in methotrexate-induced epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells
3. 学会等名 第13回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masashi Kawami, Ryoko Yumoto, Mikihisa Takano
2. 発表標題 Potent inhibitory effect of vandetanib on methotrexate-induced epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial A549 cells.
3. 学会等名 AAPS 2019 PharmSci 360 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mohi Uddin, Masashi Kawami, Ryoko Yumoto, Mikihisa Takano
2. 発表標題 Relationship between TGF 1 induced EMT and monocarboxylate transporter 1 (MCT1) in alveolar epithelial A549 cells.
3. 学会等名 AAPS 2019 PharmSci 360 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 二木空人、山上洋平、湯元良子、川見昌史、高野幹久
2. 発表標題 肺胞上皮細胞におけるメトトレキサート誘発性上皮間葉転換に対するSrc阻害剤の影響解析
3. 学会等名 第58回日本薬学会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masashi Kawami, Ryoko Yumoto, Mikihisa Takano
2. 発表標題 Suppressive effect of vandetanib on drug-induced epithelial-mesenchymal transition via inhibition of p53 pathway.
3. 学会等名 34nd JSSX Annual Meeting in Tsukuba (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takuya Hara, Ryoko Yumoto, Masashi Kawami, Mikihisa Takano
2. 発表標題 Role of nuclear factor erythroid 2 like-2 in methotrexate-induced epithelial-mesenchymal transition in cultured human alveolar epithelial A549 cells.
3. 学会等名 34nd JSSX Annual Meeting in Tsukuba (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takamichi Ojima, Ryoko Yumoto, Masashi Kawami, Mikihisa Takano
2. 発表標題 Association of methotrexate-induced epithelial-mesenchymal transition with apoptosis in human alveolar adenocarcinoma cell line A549 cell.
3. 学会等名 34nd JSSX Annual Meeting in Tsukuba (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mikihisa Takano
2. 発表標題 Effect of cigarette smoke extract on the function and expression of membrane transporters in alveolar epithelial cells
3. 学会等名 The 8th annual Meet the Experts Transporter conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ryoko Yumoto, Hidetaka Kamei, Masashi Kawami and Mikihisa Takano
2. 発表標題 A novel concept of nicotine transport across the cell membranes in human lung- and non-lung-derived culture cells
3. 学会等名 The 8th annual Meet the Experts Transporter conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yohei Yamagami, Ryoko Yumoto, Masashi Kawami, Mikihisa Takano
2. 発表標題 Role of plasminogen activator inhibitor-1 in methotrexate-induced epithelial-mesenchymal transition in cultured human alveolar epithelial A549 cells
3. 学会等名 2018 MD0/33nd JSSX Annual Meeting in Kanazawa (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ayano Yamamoto, Masashi Kawami, Ryoko Yumoto, Mikihisa Takano
2. 発表標題 Role of miR-34a and p53 pathway in drug-induced epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells
3. 学会等名 2018 MD0/33nd JSSX Annual Meeting in Kanazawa (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shunsuke Senoo, Junya Deguchi, Ryoko Yumoto, Mikihisa Takano
2. 発表標題 Search for the compound preventing drug-induced epithelial-mesenchymal transition and its mechanism in alveolar epithelial RLE/Abca3 cells
3. 学会等名 2018 MD0/33nd JSSX Annual Meeting in Kanazawa (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masashi Kawami, Takamichi Ojima, Risako Harada, Ryoko Yumoto, Mikihisa Takano
2. 発表標題 Study on association of drug-induced cell cycle arrest with epithelial-mesenchymal transition in A549 cells
3. 学会等名 2018 MD0/33nd JSSX Annual Meeting in Kanazawa (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川見昌史、山本彩乃、湯元良子、高野幹久
2. 発表標題 肺障害性薬物による肺胞上皮細胞の上皮間葉転換とmiRNAの関連解析
3. 学会等名 日本薬剤学会第33年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原拓也、本田奈津子、湯元良子、川見昌史、高野幹久
2. 発表標題 肺胞上皮細胞におけるメトトレキサート誘発性上皮間葉転換に対する葉酸代謝機構の影響解析
3. 学会等名 第57回日本薬学会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小島崇路、原田梨紗子、湯元良子、川見昌史、高野幹久
2. 発表標題 肺胞上皮細胞におけるメトトレキサート誘発性上皮間葉転換に対する葉酸代謝機構の影響解析
3. 学会等名 第57回日本薬学会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masashi Kawami, Yohei Yamagami, Risako Harada, Takamichi Ojima, Ryoko Yumoto, Mikihisa Takano
2. 発表標題 In vitro study on secreted factors associated with drug-induced epithelial-mesenchymal transition in A549 cells
3. 学会等名 The 1st Workshop of The Research Center for Drug Development and Biomarker Discovery
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川見昌史、原田梨紗子、小島崇路、湯元良子、高野幹久
2. 発表標題 肺胞上皮細胞に対するメトトレキサートの抗がん効果と上皮間葉転換誘発作用の関連解析
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 高野 幹久 (分担執筆)	4. 発行年 2018年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 252 (内 22-28)
3. 書名 次世代吸入製剤とデバイスの開発「第1編 総論 第2章 薬剤の経肺吸収機序・体内動態」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	湯元 良子 (Yumoto Ryoko)  (70379915)	広島大学・医歯薬保健学研究科(薬)・准教授  (15401)	
研究協力者	川見 昌史 (Kawami Masashi)  (20725775)	広島大学・医歯薬保健学研究科(薬)・助教  (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------