

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22390031

研究課題名(和文) 遺伝子導入による新規肺胞上皮細胞モデルの作出と薬物の肺移行・肺毒性研究への応用

研究課題名(英文) Establishment of a new alveolar epithelial cell model by gene transfection and its application to the study on drug transport and toxicity in the lungs

研究代表者

高野 幹久 (Takano, Mikihiisa)

広島大学・医歯薬保健学研究院(薬)・教授

研究者番号：20211336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円、(間接経費) 4,080,000円

研究成果の概要(和文)： 新たな肺胞上皮 Ⅱ型細胞モデルの開発を目的に、Abca3遺伝子をRLE-6TN細胞に導入した。RLE/Abca3細胞では、親細胞に比べてAbca3遺伝子の発現上昇とⅡ型に特有な細胞内小器官 lamellar bodyの形成促進が見られた。驚いたことに、Ⅱ型で高い他の遺伝子の発現やアルブミン輸送活性も亢進し、細胞形質全体がⅡ型にシフトしたものと考えられた。さらにRLE/Abca3細胞は、親細胞に比べて、肺線維症の原因となる上皮間葉転換を引き起こすTGF- β 1やブレオマイシンに優れた反応性を示し、薬剤誘発性肺線維症や間質性肺炎の解析・予測モデル系として有用と考えられた。

研究成果の概要(英文)： In order to develop a new alveolar type II epithelial cell model, Abca3 gene was introduced into RLE-6TN cells. Compared to RLE-6TN cells, the expression of Abca3 mRNA and the formation of lamellar bodies, characteristic intracellular organelle in type II cells, were increased in RLE/Abca3 cells. Surprisingly, the expression of other type II marker mRNAs and albumin uptake activity were also increased, indicating that introduction of Abca3 gene would direct RLE-6TN cells to more type II-like cells. In addition, RLE/Abca3 cells responded well to TGF- β 1 and bleomycin, compounds inducing epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells, than RLE-6TN cells. Thus, RLE/Abca3 cells may be a promising in-vitro model system to analyze and predict drug-induced lung toxicity.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：肺胞上皮細胞 Ⅱ型細胞モデル Abca3遺伝子 薬剤性肺障害 上皮間葉転換

1. 研究開始当初の背景

著者の研究室では、ラット肺から肺胞上皮型細胞を単離し、型細胞あるいは型細胞から分化転換 (trans-differentiation) させ型細胞として使用するための至適培養条件 (細胞密度、培養日数など) を設定し、これら初代培養細胞を用いることでアルブミンやインスリンなどのタンパク質・ペプチドの輸送活性、輸送機構を両細胞で比較解析してきた。その結果、肺胞腔で型細胞が占める面積は 10% 程度に過ぎないが、細胞 1 個あたりの活性が高いため、肺胞腔からのアルブミンクリアランスにおける型細胞の寄与は 70-80% と極めて大きいことなど、新たな知見を見出すことができた。しかしこれらの研究を通じて、初代培養細胞系の欠点、すなわち単離した型細胞を培養すると、日数の経過とともに型へと分化転換が進行し、さらに日数が経過すると線維芽様細胞が増えるなど、型細胞あるいは型細胞として用いることができる期間が極めて限られているため薬物長期処理の影響解析などには用いられないこと、単離できる細胞数に限りがあるため多くの実験動物を必要とすることなどを実感した。

一方、著者は、初代培養した肺胞上皮型、型細胞と比較しながら、ラット肺胞上皮由来の株化細胞 RLE-6TN も活用し、タンパク質、ペプチドの輸送研究を進めてきた。しかし、型細胞のマーカ-遺伝子の発現が低いことや、型細胞において特徴的に観察される細胞内オルガネラである lamellar body の発達が、RLE-6TN 細胞では型細胞に比べ不十分であることを認めた。すなわち、RLE-6TN 細胞は、型の形質をある程度保持しているものの完全ではなく、型と型との間に位置する細胞と考えられた。

また、プレオマイシンやシクロホスファミドをはじめとする抗がん薬、抗不整脈薬アミオダロン、抗リウマチ薬ペニシラミンなど多くの薬剤によって、薬剤性肺炎や肺線維症などの肺障害が起こることが知られており、臨床で大きな問題となっている。しかし、そのメカニズムに関しては不明であり、特に細胞レベルで解析した研究は乏しい。その原因の一つにモデル培養細胞が、in vivo の肺胞上皮細胞の形質を必ずしも反映していない点が上げられる。

2. 研究の目的

研究期間内に明らかにしようとした点は、以下の 3 点である。

肺胞上皮型細胞に高発現している遺伝子を培養細胞 RLE-6TN に導入することで、より肺の型細胞に近い形態・性質を示すモデル細胞系を新たに作出する。

肺胞上皮細胞の形質に及ぼす KGF などの成長因子やその他の化合物の影響を探索し、と併せて至適モデル細胞系を構築する。

上記の検討で得られた肺胞上皮型細胞

モデルを用い、薬物による肺障害、特に肺線維症に関わる障害発現の分子メカニズムやその検出のための分子マ-ーカーを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Abca3 遺伝子のクローニングと RLE-6TN 細胞への遺伝子導入：ラット Abca3 遺伝子は、肺から抽出した RNA をもとに、RT-PCR 法により全長 cDNA をクローニングした。得られた cDNA を pIRESpuro2 vector などに組み替え、増幅後、Lipofection 法によって RLE-6TN 細胞に導入した。さらに導入効率に問題があると考えられたため、レトロウイルスベクター (pMXs-Puro) を用いて遺伝子を導入した。

(2) 遺伝子導入細胞における mRNA 発現の解析：各種の mRNA 発現は、Real-time PCR 法により解析した。対象遺伝子としては、Abca3 の他に、型で発現の高い surfactant protein (SP)-A, SP-B, SP-C、トランスポーターである Pept2, Mrp2 などを、型で発現の高い IGFBP-6, Bcrp Caveolin-1, SglT2 などとした。

(3) Lamellar body の形成観察：生細胞を用い lamellar body を LysoTracker Red および Nile Red で、核を Hoechst 33342 で染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

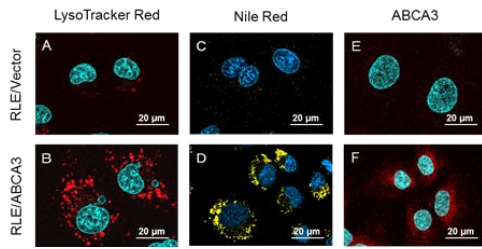
(4) Albumin の取り込み活性：FITC 標識 albumin を用い、細胞と一定時間インキュベーション後、細胞内に取り込まれた FITC-albumin を蛍光分光光度計にて定量した。

(5) TGF- β 1 および肺障害性薬物による肺胞上皮細胞の上皮間葉転換の解析：上皮間葉転換の誘発の有無や程度は、位相差顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡による細胞形態の観察、上皮系や間葉系マ-ーカー遺伝子の発現変化から評価した。また Abca3 遺伝子の発現や lamellar body 構造の変化についても解析した。

4. 研究成果

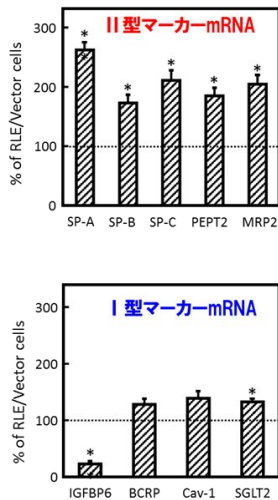
(1) Abca3 遺伝子の導入による RLE/Abca3 細胞の作出：ラット Abca3 遺伝子を RT-PCR によってクローニングし、ラット由来 RLE-6TN 細胞で安定発現系の構築を試みた。この際、Lipofection 法では成功はしたものの導入効率が悪かったため、ウイルスベクター pMXs-Puro Retroviral Vector を用い導入した。Abca3 遺伝子の導入後 puromycin 含有培地で selection を行い、安定発現株を得た。得られた RLE/Abca3 細胞における Abca3 の遺伝子およびタンパク質発現および lamellar body 様構造の形成について検討した。

次の図は RLE/Abca3 細胞およびベクター導入細胞における lamellar body の形成と Abca3 タンパク質の発現について共焦点レーザー顕微鏡で観察したものである。

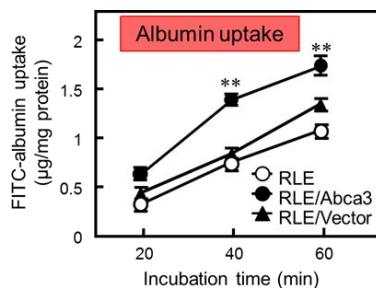


RLE/Abca3 細胞では LysoTracker Red や Nile Red で染色される lamellar body 様構造および Abca3 タンパク質の発現の増加が観察された。Abca3 は lamellar body 膜上の脂質トランスポーターで lamellar body の形成に不可欠とされる。また Abca3 mRNA の発現はベクター導入細胞に比べて RLE/Abca3 細胞で約 10 倍に増加しており、安定発現細胞株が樹立できたものと考えられた。

(2) RLE/Abca3 細胞の mRNA 発現プロファイルの変化: 得られた RLE/Abca3 細胞について、その他の変化がないか調べるため各種 mRNA の発現を解析した。



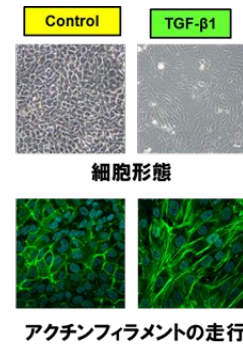
上の図は RLE/Abca3 細胞における II 型マーカー遺伝子、I 型マーカー遺伝子の発現についてベクター導入細胞と比較した結果である。驚いたことに、RLE/Abca3 細胞では Abca3 遺伝子のみならず、その他の各 II 型マーカー遺伝子の発現が上昇し、一方、I 型マーカー遺伝子の発現は、低下、あるいは大きな変化はなかった。そこで次に、アルブミン輸送活性について測定した。著者らは既にアルブミン輸送活性は、II 型細胞に比べ I 型細胞で著しく高いことを報告している。



左下の図から明らかなように、RLE/Abca3 細胞では、コントロール細胞やベクター導入細胞に比べてアルブミンの取り込み活性が優位に上昇していた。

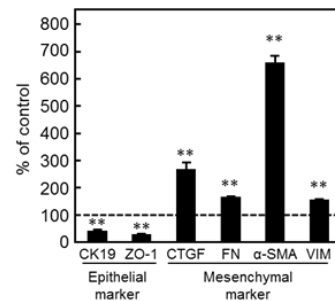
以上の結果から、RLE/Abca3 細胞では lamellar body 様構造の増加に加え II 型マーカー遺伝子の発現やアルブミン輸送活性の上昇など、その形質が全体的 II 型にシフトしているものと推察された。従って、RLE/Abca3 細胞は、肺胞上皮型細胞のモデルとして、既存の株化培養細胞に比べ、より優れたモデルと考えられる。通常、トランスポーター遺伝子の導入では、当該トランスポーターの発現以外変化しないとされるため、今回の知見は極めて新規性が高く、今後の新たなモデル細胞の開発に有用な知見と考える。なお、KGF は、初代培養細胞系では I 型形質の保持に若干の効果が見られたが、RLE-6TN 細胞に対しては大きな効果は示さなかった。

(3) TGF-β1 による RLE/Abca3 細胞の上皮間葉転換の誘発: 肺胞上皮型細胞の間葉系細胞への転換は肺線維症発症の一因と考えられている。そこでまず、RLE/Abca3 細胞を TGF-β1 で処置し上皮間葉転換が誘発されるか否かについて検討した。



上の図は TGF-β1 処置の影響について、細胞形態、アクチンフィラメントの走行から観察した結果である。TGF-β1 処置によって細胞は、上皮系に特有な敷石状の形状から筋線維芽細胞と類似した紡錘状に変化し、またアクチンフィラメントもストレスファイバー様の構造に変化した。

次に各種遺伝子の発現に対する TGF-β1 処置の影響について解析した。



上の図は、RLE/Abca3 細胞における上皮系マーカーである CK19、ZO-1 の mRNA 発現、間葉系マーカーである CTGF、FN、alpha-SMA、VIM の mRNA 発現について検討した結果で

ある。TGF- β 1 処置によって上皮系マーカー遺伝子の発現は減少し、一方、間葉系マーカー遺伝子の発現は上昇したことから、TGF- β 1 は RLE/Abca3 細胞に対して上皮間葉転換を誘発することが明らかとなった。

(4)薬物による RLE/Abca3 細胞の上皮間葉転換の誘発：副作用として間質性肺炎や肺線維症を引き起こす可能性がある薬物（プレオマイシン、メトトレキサート）について、TGF- β 1 と同様、上皮間葉転換を誘発するかどうかについて検討した。その結果、プレオマイシンやメトトレキサートは、TGF- β 1 ほど顕著でないものの、細胞形態やアクチンフィラメントのリモデリングを引き起こした。さらに、TGF- β 1 処置と同様、上皮系マーカー遺伝子の発現減少、間葉系マーカー遺伝子の発現上昇が観察されたことから、これら肺障害性薬物は RLE/Abca3 細胞に対して上皮間葉転換を誘発することが示された。

なお、重要な点として、プレオマイシンやメトトレキサートによる α -SMA の mRNA 発現上昇は RLE/Abca3 細胞では認められたが RLE-6TN 細胞では認められなかった。また型細胞マーカーである Abca3 遺伝子の発現についても調べたところ、RLE/Abca3 細胞では低下が認められたが RLE-6TN 細胞では認められなかった。従って、RLE-6TN 細胞に比べ我々が樹立した RLE/Abca3 細胞は、薬物誘発性肺線維症を解析・予測する上で優れたモデル細胞となる可能性を持つことが明らかとなった。

TGF- β 1 とプレオマイシン、メトトレキサートが、同様のメカニズムで上皮間葉転換を誘発するのかどうかについては現在のところ不明である。今後、上皮間葉転換に関わる細胞内情報伝達系の key molecule に関する解析を進め、薬剤誘発性上皮間葉転換、ひいては肺線維症の分子メカニズムを明らかにするとともに、薬剤性肺障害の予測・防御法の開発に取り組みたいと考えている。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 9 件)

1. Takano, M., Yamamoto, C., Sambuichi, K., Oda, K., Nagai, J., Shimamoto, A., Tahara, H. and Yumoto, R.: Introduction of a single transporter gene ABCA3 directs RLE-6TN to more type II-like alveolar epithelial cells. *Membrane*, 査読有, 38, 246-253, 2013 (doi: not applicable)
2. Takano, M., Horiuchi, T., Sasaki, Y., Kato Y., Nagai, J. and Yumoto, R.: Expression and function of PEPT2 during transdifferentiation of alveolar epithelial cells. *Life Sciences*, 査

読有, 93, 630-636, 2013

(doi: 10.1016/j.lfs.2013.08.008)

3. Yumoto, R., Suzuka, S., Nishimoto, S., Nagai, J. and Takano, M.: Enhancing effect of poly(amino acid)s on albumin uptake in human lung epithelial A549 cells. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 査読有, 28, 497-503, 2013 (doi.org/10.2133/dmpk.DMPK-13-RG-028)
4. Oda, K., Yumoto, R., Nagai, J. and Takano, M.: Modulation of insulin transport by D-glucose in alveolar epithelial cells. *Biomedicine & Aging Pathology*, 査読有, 3, 247-252, 2013 (doi.org/10.1016/j.biomag.2013.09.003)
5. Nagai, J., Yamamoto, A., Yumoto, R. and Takano, M.: Albumin overload induces expression of hypoxia-inducible factor 1- α and its target genes in HK-2 human renal proximal tubular cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 434, 670-675, 2013 (doi: 10.1016/j.bbrc.2013.03.140)
6. Takano, M., Horiuchi, T., Nagai, J. and Yumoto, R.: Effect of cigarette smoke extract on insulin transport in alveolar epithelial cell line A549. *Lung*, 査読有, 190, 651-659, 2012 (doi: 10.1007/s00408-012-9413-9)
7. Oda, K., Yumoto, R., Nagai, J., Katayama, H. and Takano, M.: Enhancement effect of poly(amino acid)s on insulin uptake in alveolar epithelial cells. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 査読有, 27, 570-578, 2012 (doi.org/10.2133/dmpk.DMPK-12-RG-002)
8. Yumoto, R., Suzuka, S., Oda, K., Imaoka, H. and Nagai, J. and Takano, M.: Endocytic uptake of FITC-albumin by human alveolar epithelial cell line A549. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 査読有, 27, 336-343, 2012 (doi:10.2133/dmpk.DMPK-11-RG-127)
9. Oda, K., Yumoto, R., Nagai, J., Katayama, H. and Takano, M.: Mechanism underlying insulin uptake in alveolar epithelial cell line RLE-6TN. *Eur. J. Pharmacol.*, 査読有, 672, 62-69, 2011 (doi:10.1016/j.ejphar.2011.10.003)

[総説](計 1 件)

1. Takano, M. and Yumoto, R.: Transport of proteins and peptides and its regulation in alveolar epithelial cells. *Membrane*, 査読有, 36, 145-153, 2011 (doi: not applicable)

[学会発表](計 25 件)

1. 杉本奈津美, 湯元良子, 山本千恵子, 永井純也, Carsten Ehrhardt, 高野幹久: ヒト肺上皮由来 H441 細胞の基本特性とペプチドトランスポーター PEPT2 の発現・機能, 日

- 本薬学会第 134 年会, 2014 年 3 月 27 ~ 30 日, 熊本市
2. Yamamoto, A., Nagai, J., Toshimori, F., Katagiri, Y., Yumoto, R. and Takano, M.: Effect of albumin-bound fatty acids on the expression of HIF-1-alpha and its target genes in the human renal tubular epithelial cell line HK-2. 28th JSSX Annual Meeting in Tokyo, 9-11 Nov 2013, Tokyo
 3. Yumoto, R., Sasaki, Y., Horiuchi, T., Kato, Y., Kishimoto, U., Nagai, J. and Takano, M.: Expression and function of P-glycoprotein in alveolar epithelial cells and its modulation by cigarette smoke extract. 31 Aug - 5 Sep 2013, Dublin, Ireland
 4. 西本沙央里, 小田啓祐, 永井純也, 湯元良子, 高野幹久: 糖尿病患者における経肺投与インスリンのバイオアベイラビリティ上昇の機構解明, 医療薬学フォーラム 2013/第 21 回クリニカルファーマシーシンポジウム, 2013 年 7 月 20 ~ 21 日, 金沢市
 5. 岸本海, 佐々木佳寛, 山本千恵子, 堀内大士, 永井純也, 湯元良子, 高野幹久: 喫煙者における経肺投与インスリンのバイオアベイラビリティ上昇機構の解明, 医療薬学フォーラム 2013/第 21 回クリニカルファーマシーシンポジウム, 2013 年 7 月 20 ~ 21 日, 金沢市
 6. 山口晃輝, 三分一圭祐, 山本千恵子, 永井純也, 湯元良子, 高野幹久: 肺胞上皮細胞の上皮間葉転換と薬剤性肺傷害予測法の構築, 日本薬学会第 28 年会, 2013 年 5 月 23 ~ 25 日, 名古屋市
 7. 小田啓祐, 湯元良子, 永井純也, 高野幹久: D-グルコースによるインスリンの肺胞上皮細胞輸送の制御, 第 35 回日本膜学会年会, 2013 年 5 月 20 ~ 21 日, 東京都
 8. 佐々木佳寛, 堀内大士, 永井純也, 湯元良子, 高野幹久: 肺胞上皮細胞の II 型-I 型分化転換に伴うペプチドトランスポーター Pept2 の発現・機能変動, 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 28 ~ 30 日, 横浜市
 9. 小田啓祐, 湯元良子, 永井純也, 高野幹久: D-Glucose stimulates insulin uptake in cultured human alveolar epithelial cells. 第 6 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム, 2012 年 11 月 23 ~ 24 日, 京都市
 10. Yamamoto, C., Yumoto, R., Sambuichi, K., Oda, K., Nagai, J. and Takano, M.: Induction of phenotypical changes by transfection of a transporter gene Abca3 in cultured alveolar epithelial cell line RLE-6TN. 27th JSSX Annual Meeting in Tokyo, 20-22 Nov 2012, Tokyo
 11. Oda, K., Yumoto, R., Nagai, J. and Takano, M.: Effect of D-glucose on insulin uptake in human alveolar epithelial cell line A549. 27th JSSX Annual Meeting in Tokyo, 20-22 Nov 2012, Tokyo
 12. 湯元良子, 鈴鹿小百合, 永井純也, 高野幹久: 肺胞上皮細胞におけるアルブミンの輸送とその制御, 膜シンポジウム 2012, 2012 年 11 月 6 ~ 7 日, 神戸市
 13. Takano, M., Sambuichi, K., Yamamoto, C., Oda, K., Nagai, J. and Yumoto, R.: Effect of transfection of a transporter gene Abca3 on the phenotype of cultured alveolar epithelial cells. 18th North American Regional ISSX Meeting, 14-18 Oct 2012, Dallas, USA
 14. 小田啓祐, 湯元良子, 鈴鹿小百合, 永井純也, 高野幹久: ラットおよびヒト由来培養肺胞上皮細胞における albumin 取り込み機構の解析, 日本薬学会第 131 年会, 2011 年 3 月 28 ~ 31 日, 静岡市
 15. 堀内大士, 湯元良子, 佐々木佳寛, 永井純也, 高野幹久: 肺胞上皮細胞の II 型-I 型分化転換とオリゴペプチドトランスポーター PEPT の発現・機能, 日本薬学会第 27 年会, 2012 年 5 月 24 ~ 26 日, 神戸市
 16. 湯元良子, 堀内大士, 加藤祐貴, 永井純也, 高野幹久: 肺胞上皮細胞の II 型-I 型分化転換と生体膜トランスポーターの発現・機能, 日本膜学会第 34 年会, 2012, 5 月 8-9 日, 東京
 17. 湯元良子, 堀内大士, 小田啓祐, 永井純也, 高野幹久: 培養肺胞上皮細胞におけるインスリン輸送に及ぼすタバコ煙抽出物の影響, 日本薬学会第 132 年会, 2012 年 3 月 29 ~ 31 日, 札幌市
 18. Horiuchi, T., Oda, K., Nagai, J., Yumoto, R. and Takano, M.: Effect of cigarette smoke extract (CSE) on insulin uptake in human alveolar epithelial cell line A549. 26th JSSX Annual Meeting in Hiroshima, 16-18 Nov 2011, Hiroshima
 19. 小田啓祐, 鈴鹿小百合, 湯元良子, 永井純也, 高野幹久: 肺胞上皮細胞における albumin 取り込みの分子機構の解明, 日本薬学会第 26 年会, 2011 年 5 月 29 日 ~ 31 日, 東京
 20. 高野幹久, 湯元良子: 肺胞上皮細胞におけるタンパク質・ペプチドの輸送とその制御, 日本膜学会第 33 年会, 2011 年 5 月 12 ~ 13 日, 東京
 21. 小田啓祐, 湯元良子, 鈴鹿小百合, 永井純也, 高野幹久: ラットおよびヒト由来培養肺胞上皮細胞における albumin 取り込み機構の解析, 日本薬学会第 131 年会, 2011 年 3 月 28 ~ 31 日, 静岡市
 22. Yumoto, R., Kato, Y., Horiuchi, T., Nagai, J. and Takano, M.: Effect of Smoking-related Compounds on The Structure and Function of Alveolar Epithelial Cells in Culture. PSWC2010, 14-18 Nov 2010, New Orleans, U.S.A.
 23. 堀内大士, 湯元良子, 加藤祐貴, 永井純也, 高野幹久: ヒト肺胞上皮由来 A549 細胞の形態・機能に及ぼす喫煙関連物質の影響解析, 第 49 回

日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会
中国四国支部学術大会, 2010年11月6~7日,
米子市

24. 鈴鹿小百合, 湯元良子, 小田啓祐, 永井純也,
高野幹久: ヒト肺胞上皮由来 A549 細胞における
アルブミン取り込みの特性解析, 第 49 回日本薬学
会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四
国支部学術大会, 2010年11月6~7日, 米子市
25. 三分一圭祐, 湯元良子, 堀内大士, 永井純也,
高野幹久: 肺胞上皮由来 RLE-6TN 細胞の形質
制御に関する検討, 日本薬剤学会第 25 年会,
2010年5月12~14日, 徳島市

〔図書〕(計 2 件)

1. Nagai, J. and Takano, M.: Gp60-mediated transport of albumin in endothelial and non-endothelial cells. In "HUMAN SERUM ALBUMIN" ed. by Otagiri, M., Sojo University, Japan, 2013, pp.123-135
2. 高野幹久, 湯元良子: 肺胞上皮細胞におけるアルブミンおよびインスリンの輸送機構の解析, 「遺伝子医学 MOOK 別冊 ペプチド・タンパク性医薬品の新規 DDS 製剤の開発と応用」, 山本 昌編, pp. 172-177, メディカルドウ, 2011

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高野 幹久 (TAKANO MIKIHISA)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・
教授
研究者番号: 20211336

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

湯元 良子 (YUMOTO RYOKO)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・
助教
研究者番号: 70379915

永井 純也 (NAGAI JUNYA)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・
准教授
研究者番号: 20301301