

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870584

研究課題名(和文)メトトレキサート誘発肺障害発症機序におけるOATP4C1の役割の解明

研究課題名(英文) Involvement of Organic anion Transporting Polypeptide 4C1 in mechanism of methotrexate-induced lung injury

研究代表者

大林 真幸(OHBAYASHI, MASAYUKI)

昭和大学・薬学部・講師

研究者番号：70349041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はMTX誘発肺線維化の発症機序として、OATP4C1ダウンモデルを用いることで、OATP4C1を介したMTXの細胞内への蓄積により細胞障害されることが示された。また、肺胞上皮細胞の一部がEMTを介して筋線維芽細胞に分化することで、肺線維化が惹起されることが示された。以上のことから、MTX誘発肺線維化の過程においてEMTとOATP4C1の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Our present study revealed that, at least in part, intracellular accumulation of MTX in alveolar epithelial cells via organic anion transporting polypeptide 4C1 (OATP4C1) resulted in the induction of pulmonary fibrosis in OATP4C1 knockdown mice. Additionally, we found that changing from alveolar cells to myofibroblast through EMT also resulted in the induction of pulmonary fibrosis. Thus, our results suggest that both EMT and OATP4C1 are important determinants for causing MTX-induced pulmonary fibrosis.

研究分野：薬剤性肺線維症

キーワード：肺胞上皮細胞 OATP4C1 EMT 肺線維化 メトトレキサート

1. 研究開始当初の背景

薬剤性肺障害は、患者の Quality of life (QOL) の低下や治療への意欲の低下を招くことから、臨床上、それを回避することは重要な課題である。また、近年、分子標的薬をはじめとする有効性が高い医薬品が開発される一方で、肺障害の副作用により、中止に至ることも多く、臨床において薬剤性肺障害発症機序の解明および抑制方法の開発が急務となっている。

2. 研究の目的

本研究では薬剤性肺障害発症機序を解明すべく、まず臨床において十分な使用実績があり、かつ肺障害の副作用が報告されている関節リウマチ治療薬であるメトトレキサート (MTX) に着目した。MTX は、関節リウマチ治療ガイドラインにおいて第1選択に位置づけられており、確定診断後、早期からの使用が推奨されている。その反面、投与量や服用年数に関わらず間質性肺炎が発症し、患者を致死の状態もしくは死に至らせている。報告者は、これまでに MTX 誘発肺線維化モデル動物および初代肺上皮細胞・肺線維芽細胞の単離培養を用いて、MTX 誘発肺障害発症機序を *in vivo* および *in vitro* にて解明を行ってきた。その結果、マウス肺から単離した初代肺上皮細胞および肺線維芽細胞を用いて、MTX の輸送を担う ABC トランスポーター9 種類、Slc トランスポーター15 種類の発現比較を検討し、肺線維芽細胞は Abc トランスポーター (Mdr1、Mrp1、4、5、Bcrp) の発現が有意に高く、肺上皮細胞は Mrp3、OATP4C1 の発現が有意に高いことを報告した。さらに [³H]MTX を用いた細胞内への取り込み能を比較したところ、有意に肺上皮細胞で高い一方で MTX に対する IC₅₀ は肺線維芽細胞の方が高かった。このことから、OATP4C1 を介した肺上皮細胞内への MTX の取り込みが直接的に細胞障害に寄与する可能性が示唆された。このことから OATP4C1 に焦点を絞り、薬剤性肺障害発症機序における肺上皮細胞の細胞障害過程ならびに線維化過程における薬物トランスポーターの新たな役割を明らかにすることは、臨床に極めて重要であると考えている。

一方、肺線維化の引き金は慢性炎症ではなく、何らかの原因による細胞傷害に起因した異常な創傷治癒反応であり、それに伴った炎症反応の結果、線維化が進行していくという説が多く支持されている。近年、組織線維化の病態解明において、成人組織での分化した上皮細胞がある一定の条件下で間葉系細胞に表現型を変え、組織のリモデリング・線維化に関与するという上皮-間葉細胞転換 (Epithelial Mesenchymal Transition : EMT) が明らかとなってきた。

そこで、報告者は、MTX による肺障害発症過程に肺上皮細胞に特異的に発現する薬物トランスポーター (OATP4C1) の役割に着目し、肺上皮細胞の細胞障害過程および EMT における OATP4C1 の関与を明らかにする。

3. 研究の方法

MTX 誘発肺線維化モデルマウス (C57BL/6 マウスに MTX 3 mg/kg 35 日間連日経口投与) を用

いて、肺線維化過程において EMT がどのように関与しているかを検討した。EMT の代表的な指標である肺胞上皮細胞のマーカーである E-cadherin と間葉系マーカーである α -SMA、vimentin 等について、その発現変化を観察した。In vitro において肺胞上皮細胞が間葉系細胞の形質を獲得するかどうかについて、ヒト肺胞上皮細胞 (A549 細胞) を用いて、EMT の指標である遊走能に対する MTX の影響を検討した。さらに OATP4C1 のノックダウンモデルの作成を行い、MTX による細胞障害への影響を検討した。

(1) E-cadherin、 α -SMA の発現解析

MTX 誘発肺線維化モデルマウスの肺組織をパラホルムアルデヒドにて固定し、パラフィン切片を作成する。肺胞上皮細胞のマーカーである E-cadherin と間葉系マーカーである α -SMA との二重染色によって局在を明らかにし、MTX 誘発肺線維化モデルにおける肺障害発症過程において、肺胞上皮細胞の EMT を介した筋線維芽細胞への分化が線維化に寄与しているかを評価した。また、培養細胞 (マウス初代肺胞上皮細胞、A549) においても免疫細胞染色を用いて E-cadherin と α -SMA の局在を評価し、さらに MTX 処置による発現変化についてウエスタンブロッティング、qRT-PCR 法を用いて検討した。

(2) Wound healing assay 法

A549 細胞は 35 mm シャーレに播種し、コンフルエンスまで培養した。MTX (0.3、1、3 μ M) またはポジティブコントロールとして TGF- β (5 ng/mL) を処置し、24 時間後に遊走能を評価した。

(3) OATP4C1 ノックダウンモデルの作成と評価
A549 細胞 (ヒト肺胞上皮細胞) に siRNA を導入することで OATP4C1 発現抑制モデルを作製した。OATP4C1 の発現量はウエスタンブロット法と real-time RT-PCR 法を用いて解析した。さらに、本モデルを用いて MTX による細胞障害に対する OATP4C1 の関与について、XTT アッセイ法を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) E-cadherin ならび α -SMA の発現変化

MTX 誘発肺線維化モデルマウス (MTX 3 mg/kg 35 日間連日経口投与) の肺切片を用いて上皮細胞マーカーである E-cadherin と筋線維芽細胞マーカーである α -SMA、vimentin の発現変化を免疫組織化学染色法にて検討した。その結果、コントロール群では肺胞壁に E-cadherin 陽性細胞 (green) が認められたが、 α -SMA 陽性細胞 (red) はほとんど認められなかった (図 1c and e)。一方、MTX 誘発肺線維化モデルマウスの肺線維化巣では明らかな E-cadherin 陽性細胞の減少ならびに vimentin、 α -SMA 陽性細胞の増加が認められた (図 1d and b, f)。このことから、MTX 投与により肺胞上皮細胞の欠落と筋線維芽細胞の増加を介して肺線維化が生じていることが示唆された。さらに、E-cadherin と α -SMA の2重蛍光染色を行った結果、MTX 投与群の肺線維化巣に α -SMA 陽性細胞と E-cadherin 陽性細胞が共局在 (yellow) していることが明らかとなった (図 1j)。

以上のことから、MTX 投与により生じた肺線維化過程に EMT を介した筋線維芽細胞が存在し、線維化巣に動員されていることが示された。

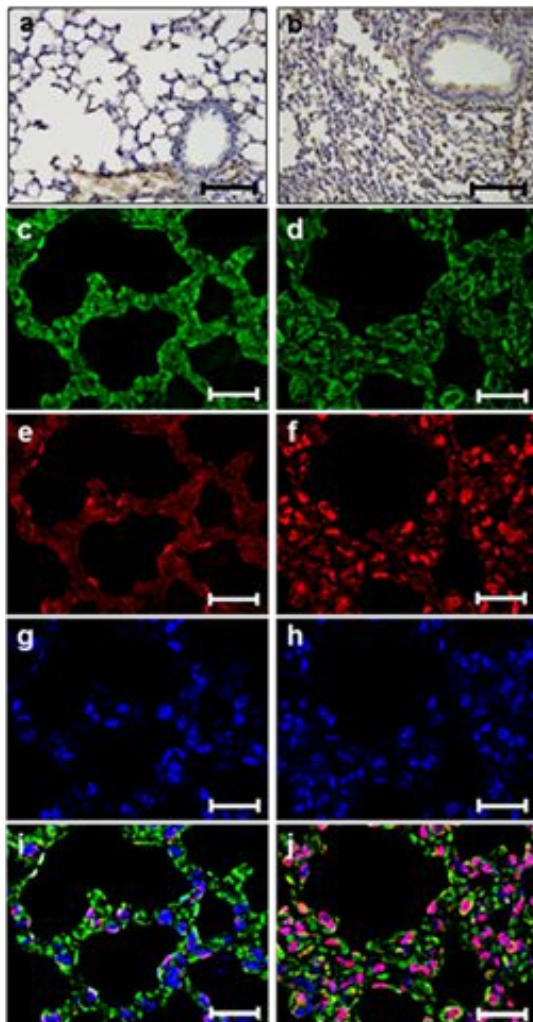


図1 MTX 誘発肺線維化モデルマウスにおける E-cadherin ならびに α -SMA の共局在
コントロール群は a, c, e, g, i を MTX 投与群は b, d, f, h, j を示す。

マウス初代肺胞上皮培養細胞に MTX を処置することによって、敷石状から紡錘体状への細胞形態変化、E-cadherin の発現抑制ならびに α -SMA の発現増加が認められ、EMT が生じていることが示された。また A549 細胞でも同様の結果が得られた。

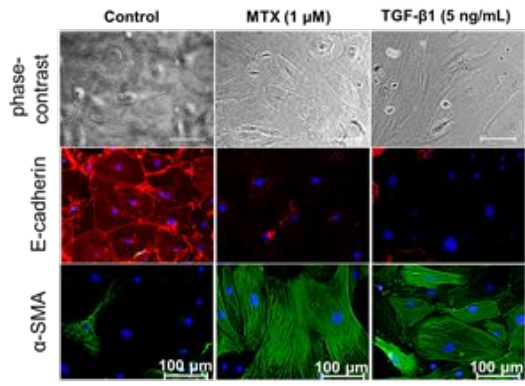


図2 MTX 処置後のマウス肺胞上皮細胞における E-cadherin および α -SMA の発現変化

MTX を A549 細胞に処置後に E-cadherin および α -SMA のタンパク質発現変化を検討したところ、MTX 処置により、E-cadherin の発現低下ならびに α -SMA の発現増加が認められた。

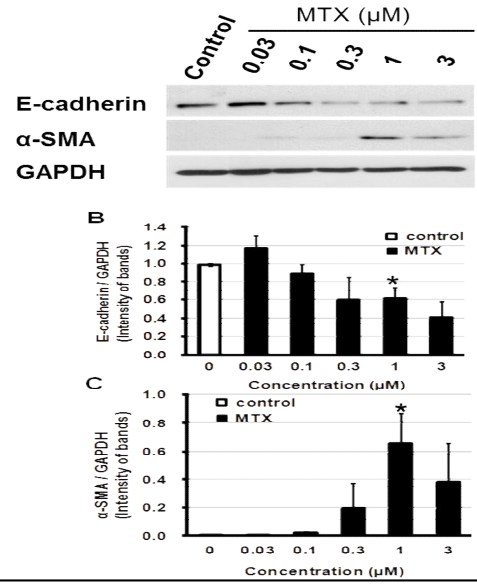


図3 MTX 処置後の A549 細胞における E-cadherin および α -SMA の発現変化

(2) OATP4C1 ノックダウンモデルの作成と評価
A549 細胞(ヒト肺胞上皮細胞)に siRNA を導入し、OATP4C1 発現抑制モデルを作製し、OATP4C1 の発現量はウエスタンブロット法および real-time RT-PCR 法を用いて解析した。ノックアウトモデルにおける OATP4C1 の発現を real-time RT-PCR を用いて定量解析をした結果、顕著な発現量の低下が認められた。また、ウエスタンブロットおよび免疫細胞染色法においても、発現の低下が認められたことから、ノックダウンモデルの作成が出来た。さらに、その機能を評価するために MTX 0.1-1 μ M を A549 細胞に処置 72 後に XTT 法を用いて細胞障害を比較検討した。その結果、OATP4C1 ノックダウンモデルに比べて、コントロール群において細胞生存率の低下が認められた。

以上の結果から、本研究は MTX 誘発肺線維化の発症機序として、OATP4C1 を介した MTX の細胞内への蓄積により肺胞上皮細胞が障害され、さらに肺胞上皮細胞が EMT を介して筋線維芽細胞に分化することで、肺線維化が惹起されることを示唆した。今後は、肺胞上皮細胞における OATP4C1 の役割、特に EMT と細胞障害過程に焦点を当て、さらに詳細について検討をしていく予定である。将来、MTX を服用している多くのリウマチ患者が長期にわたり安全で有効な薬物治療を受けられるようにするために、肺胞上皮細胞の障害を最小限に抑える方法の開発を目指していきたい。

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 0 件)

(学会発表)(計 2 件)

1. 大林 真幸, 久保田 聡, カワセ 彩, 神山 紀子, 小林 靖奈, 山元 俊憲. Methotrexate 誘発肺線維化における EMT を介した肺胞上皮細胞の関与. 第 41 回日本毒性学会学術年会. 2014 年 7 月 2 日 ~ 4 日. 神戸コンベンションセンター(神戸).
2. 大林 真幸, 神山 紀子, 小林 靖奈, 山元 俊憲, 向後 麻里. メトトレキサート誘発肺胞上皮細胞障害時における OATP4C1 の関与. 日本薬学会第 137 年会. 2017 年 3 月 24 日 ~ 27 日. 仙台国際センター(仙台).

(図書)(計 0 件)

該当なし

(産業財産権)

出願状況(計 0 件)

該当なし

取得状況(計 0 件)

該当なし

(その他)

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

大林真幸(OHBAYASHI, MASAYUKI)

昭和大学・薬学部・講師

研究者番号: 70349041