

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08074

研究課題名(和文) 薬剤性肺障害の原因となる上皮間葉転換の機構解明とその予防法・治療法の探索

研究課題名(英文) Study on the mechanism of epithelial-mesenchymal transition as a cause of drug-induced lung injury, and development of the strategy for preventing the injury

研究代表者

湯元 良子 (Ryoko, Yumoto)

広島大学・医歯薬保健学研究科(薬)・准教授

研究者番号：70379915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)： 薬剤性の肺線維症は極めて重篤な障害であるが、その発症機構には不明な点が多く予防法・治療法も確立されていない。近年、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)が肺線維化の一因として注目されている。

本研究では薬剤誘発性EMTの優れたin vitro評価系としてRLE/ABCA3細胞を樹立し、bleomycinのEMT誘発機構の一部にTGF- β 1が関与している可能性を明らかにした。さらに、肺胞上皮細胞においてquercetinはTGF- β 1および薬剤誘発性のEMTを抑制し、その抑制効果にはROS産生増加の抑制やTGF- β 1/smad経路の阻害が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： Many drugs used in clinical pharmacotherapy often induce serious injury of the lungs and sometimes result in lethal interstitial lung diseases. Though there is a great variation in the reported values about the prevalence of drug-induced lung diseases, it is high especially in the case of bleomycin. It is now recognized that epithelial-mesenchymal transition (EMT) plays an essential role in the fibrosis of various organs and is acknowledged to be one of the mechanisms underlying the generation of mesenchymal cells participating in tissue fibrosis.

In this study, we have found that RLE/Abca3 cells is a good in-vitro model to study drug-induced EMT, and TGF- β 1 would be involved in the mechanism underlying bleomycin-induced EMT. In addition, quercetin, a flavonoid, may be a good therapeutic agent for drug-induced lung injury, which inhibits the intracellular ROS production and the TGF- β 1/smad pathway.

研究分野：薬剤学

キーワード：薬物動態学 薬剤性肺障害 肺胞上皮細胞 上皮間葉転換 TGF- β 1 quercetin

1. 研究開始当初の背景

薬剤性肺障害は重篤な副作用であり、ブレオマイシン(BLM)、メトトレキサート(MTX)、分子標的薬ゲフィチニブなどの抗悪性腫瘍薬、関節リウマチ治療薬、免疫抑制薬、小柴胡湯などの漢方薬をはじめ多種多様な薬剤によって引き起こされる。特に肺組織の線維化が進行した肺線維症(pulmonary fibrosis)は5年後の死亡率が約50%にも上るなど、その予後は著しく不良である。

近年、肺線維化の原因として、肺胞上皮型細胞の筋線維芽細胞への転換(上皮間葉転換 Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT))が注目されるようになってきた。一方、肺線維症の進行には、TGF-β1が重要な役割を担っていることが知られているが、間質性肺炎や肺線維症を引き起こすとされる薬物が、TGF-β1と同様、細胞レベルで肺胞上皮細胞のEMTを誘発するか否かに関する情報は極めて乏しく、現在のところ不明である。

薬剤性の間質性肺炎、肺線維症が起こった場合の一般的な対処としては、まず原因と疑われる薬剤の投与を速やかに中止し、症状が重篤な場合は、ステロイド剤が投与される。しかし細胞の障害を伴う場合には効果が乏しく、また感染を伴う場合には増悪を招く恐れもある。近年、ピルフェニドンが特異性肺線維症の治療薬として導入されたが、副作用として多くの患者で認められている光過敏症やそれに伴う皮膚がん発症の可能性、肝機能障害などがあり、肺線維症の治療に精通している医師のもとに慎重に使用しなければならない薬物である。このため、より有効性・安全性の高い肺線維症治療薬が求められているのが現状であり、EMTを介した上皮細胞の線維化過程は、新たな治療ターゲットとして期待される。

2. 研究の目的

本研究では、肺胞上皮細胞を用い、薬剤性肺障害の原因となるEMT誘発の分子機構を解明することを第一の目的とする。次に、EMTを抑制する化合物・薬物を探索・同定し、薬剤性肺障害の予防法・治療法を開発することを第二の目的とする。

3. 研究の方法

1) 使用細胞: 培養肺胞上皮細胞として、ラットの正常な肺由来 RLE-6TN 細胞、当研究室で RLE-6TN に脂質トランスポーター ABCA3 の遺伝子を導入し樹立した RLE/ABCA3 細胞、およびヒト肺腺癌由来 A549 細胞を用いた。

2) 薬物処置: 細胞を播種後1日目から肺線維症誘発因子である TGF-β1 (10 ng/mL) で48時間または72時間処置、あるいは肺障害性薬物である BLM (0.4 μM) や MTX (0.1 μM) で72時間または144時間処置した。

3) 細胞の形態観察: 薬物処置した細胞を位

相差顕微鏡にて観察した。また、glass bottom culture dish に播種した細胞を BODIPY @FL phalloidin、Hoechst33342 を用いて、それぞれ F-actin、核を染色し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

4) 発現解析: 細胞から total RNA を抽出し、real-time PCR 法にて遺伝子 (mRNA) 発現量を測定した。細胞を溶解し、Western blotting 法を用いてタンパク質発現を解析した。

5) 活性酸素種 (ROS) レベルの測定: 5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate (carboxy-DCFDA) を蛍光プローブとして用い、フローサイトメトリーにより測定した。

4. 研究成果

1) TGF-β1 処置 (48, 72 時間) によって、各種細胞の形態は紡錘状となり、アクチンフィラメントのリモデリングも観察された。さらに RLE/Abca3 細胞を TGF-β1 で72時間処置したところ、上皮系マーカーである cytokeratin 19 (CK19) や zonula occludens 1 (ZO-1) の遺伝子発現量の減少が認められた。また、間葉系マーカーである connective tissue growth factor (CTGF)、fibronectin (FN)、α-smooth muscle actin (α-SMA) および vimentin (VIM) の遺伝子発現量の増加も認められたことから、RLE/Abca3 細胞において TGF-β1 によって EMT が誘発されていることが明らかとなった。(Fig.1) (発表論文9)

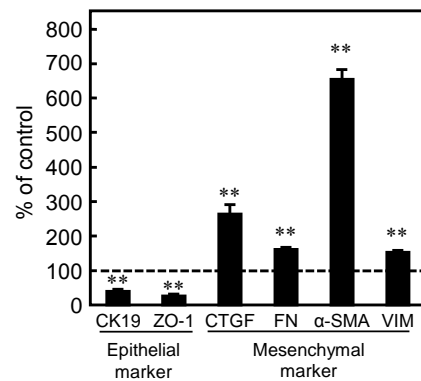


Fig.1. RLE/Abca3 細胞における上皮系マーカー遺伝子および間葉系マーカー遺伝子の発現量に及ぼす TGF-β1 の影響

2) RLE/ABCA3 細胞では TGF-β1 処置によって ABCA3 遺伝子の発現量が有意に減少したことから、ABCA3 遺伝子は EMT の新たなマーカーとなる可能性が示唆された。(発表論文9)

3) RLE/ABCA3 細胞を BLM で処置したところ、間葉系マーカーとして重要な α-SMA の遺伝子の発現量が有意に上昇し、ABCA3 遺伝子の発現量は有意に減少した。一方、RLE 細胞では有意な変化が認められなかった。(Fig.2) (発表論文9)

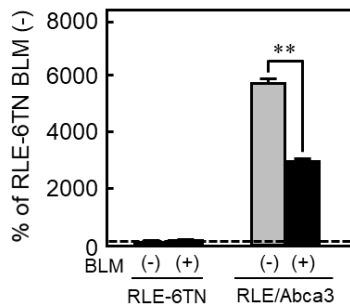


Fig.2. RLE-6TN および RLE/Abca3 細胞における α -SMA 遺伝子の発現量に対する BLM の影響

4) RLE/ABCA3 細胞に対して、TGF- β 1 と TGF- β receptor 阻害剤である SB431542 を併用処置したところ、RLE/Abca3 細胞の形態変化が抑制された。さらに、遺伝子発現解析においても上皮系マーカー遺伝子、間葉系マーカー遺伝子、および新たな EMT マーカーと考えられる Abca3 遺伝子の発現変動は有意に抑制された。

5) BLM 誘発性 EMT に対する SB431542 併用の効果についても検討した結果、RLE/Abca3 細胞の形態変化や上皮系マーカー遺伝子、Abca3 遺伝子発現減少に影響は認められなかったが、間葉系マーカー遺伝子の発現上昇は全て阻害された。

6) 抗線維化薬である pirfenidone は、RLE/Abca3 細胞において TGF- β 1、BLM によって誘発された EMT は抑制しなかったが、MTX によって誘発された EMT を一部抑制する可能性が示唆された。

7) 薬剤誘発性 EMT を抑制する化合物の探索を行った結果、phenylbutyrate や α -tocopherol は BLM による肺胞上皮細胞の紡錘状への形態変化を抑制し、N-acetyl-L-cysteine や troglitazone は MTX による細胞の形態変化を抑制した。一方、抗酸化剤である ascorbic acid と植物ポリフェノールである quercetin は、TGF- β 1 および BLM、MTX による細胞の形態変化、アクチンフィラメントのリモデリングおよび α -SMA の mRNA やタンパク質発現の増加を顕著に抑制した。従って ascorbic acid や quercetin は、薬剤性 EMT を幅広く抑制し得る有望な化合物である可能性が示唆された。(Fig. 3)

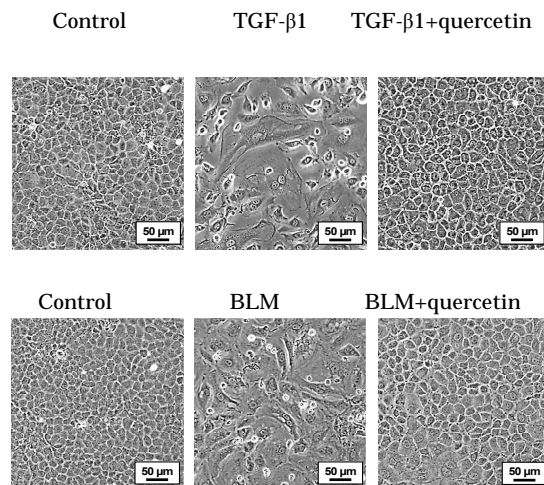


Fig.3 TGF- β 1 および BLM 処置による RLE/Abca3 細胞の形態変化に及ぼす quercetin の影響

8) 近年、TGF- β 1 による細胞内 ROS 産生の増加が EMT の誘発に関与しているという報告がある。さらに、quercetin はポリフェノールであり、抗酸化作用を有することが知られている。そこで、RLE/Abca3 細胞を用いて、細胞内の ROS 産生増加に及ぼす quercetin の影響を解析した。その結果、TGF- β 1、BLM、MTX によって誘発された細胞内の ROS 産生増加は、quercetin の共処置により有意に抑制された。

9) TGF- β /smad 経路は、以前から EMT 誘発への関与が報告されており、当研究室においても肺胞上皮細胞 A549 を TGF- β 1 および MTX で処置することにより、TGF- β /smad シグナル経路の活性化に重要な smad2 のリン酸化が亢進することを報告している(発表論文 8)。そこで、RLE/Abca3 細胞を用いて、smad2 のリン酸化に及ぼす BLM と quercetin の影響を解析した。その結果、BLM 処置により smad2 のリン酸化の亢進が認められ、そのリン酸化の亢進は quercetin の共処置により有意に抑制された。

以上の結果から、当研究室で樹立した RLE/ABCA3 細胞は薬剤誘発性の EMT を *in vitro* で評価する上で、優れたモデルであり、BLM の EMT 誘発機構の一部に TGF- β 1 が関与する可能性が示唆された。さらに、肺胞上皮細胞において quercetin は TGF- β 1 および薬剤誘発性の EMT を抑制する有用な化合物であり、その抑制効果には ROS 産生増加の抑制や TGF- β /smad 経路の阻害が関与してい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薬剤誘発性の肺線維症の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
(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 12 件)

1. Takano, M., Nekomoto, C., Kawami, M., Yumoto, R.: Role of miR-34a in TGF- β 1- and drug-induced epithelial-mesenchymal transition in alveolar type II epithelial cells, *J. Pharm. Sci.*, 査読有, 106: 2868-2872, 2017 (doi:org/10.1016/j.xphs.2017.04.002)
2. Kawami, M., Deguchi, J., Yumoto, R., Sakakibara, N., Tsukamoto, I., Konishi, R., Takano, M.: Effect of COA-Cl on transforming growth factor- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in RLE/Abca3 cells, *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 査読有, 32, 224-227, 2017 (doi:10.1016/j.dmpk.2017.05.00)
3. Takano, M., Kamei, H., Nagahiro, M., Kawami, M., Yumoto, R.: Nicotine transport in lung and non-lung epithelial cells, *Life Sciences*, 査読有, 188, 76-82, 2017 (doi: 10.1016/j.lfs.2017.08.030)
4. Ehrhardt, C., Backman, P, Couet, W., Edwards, C, Forbes, B., Friden, M., Gumbleton, M., Hosoya, K., Kato, Y., Nakanishi, T., Takano, M., Terasaki, T. and Yumoto, R.: Current progress toward a better understanding of drug disposition within the lungs: summary proceedings of the 1st Workshop on Drug Transporters in the Lungs, *J. Pharm. Sci.*, 査読有, 106, 2234-2244, 2017 (doi: 10.1016/j.xphs.2017.04.011)
5. Kawami, M., Yamada, Y., Toshimori, F., Issarachot, O., Junyaprasert, V.B., Yumoto, R., Takano, M.: Effect of Curcuma comosa extracts on the functions of peptide transporter and P-glycoprotein in intestinal epithelial cell. *Pharmazie*, 査読有, 72(2):123-127, 2017 (doi: 10.1691/ph.2017.6147)
6. Takano, M., Nagahiro, M., Yumoto, R.: Transport mechanism of nicotine in primary cultured alveolar epithelial cells. *J. Pharm. Sci.*, 査読有, 105, 982-988, 2016 (doi: 10.1002/jps.24627)
7. Takano, M., Naka, R., Sasaki, Y, Nishimoto, S, Yumoto, R.: Effect of cigarette smoke extract on P-glycoprotein function in primary cultured and newly developed alveolar epithelial cells. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 査読有, 31, 417-424, 2016 (doi.org/10.1016/j.dmpk.2016.08.006)
8. Kawami, M., Harabayashi, R., Miyamoto, M., Harada, R., Yumoto, R., Takano, M.: Methotrexate-induced epithelial-mesenchymal transition in the alveolar epithelial cell line A549, *Lung*, 査読有, 194, 923-930, 2016 (doi:10.1007/s00408-016-9935-7)
9. Takano, M., Yamamoto, C., Yamaguchi, K., Kawami, M. and Yumoto, R.: Analysis of TGF- β 1- and drug-induced epithelial-mesenchymal transition in cultured alveolar epithelial cell line RLE/Abca3. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 査読有, 30 (1):111-118, 2015 (doi.org/10.1016/j.dmpk.2014.10.007)
10. Kawami, M., Miyamoto, M., Yumoto, R., Takano, M.: Methotrexate influx via folate transporters into alveolar epithelial cell line A549. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 査読有, 30 (4):276-281, 2015 (doi.org/10.1016/j.dmpk.2015.04.005)
11. Takano, M., Sugimoto, N., Ehrhardt, C., Yumoto, R.: Functional expression of PEPT2 in the human distal lung epithelial cell line NCI-H441. *Pharm. Res.* 査読有, 32(12):3916-26, 2015 (doi: 10.1007/s11095-015-1751-x).
12. Yumoto, R., Hirabayashi, Y., Imaoka, H., Saki Toyota, S., Takano, M.: Development of a novel stop solution for membrane transport study. *MEMBRANE*, 査読有, 40(5), 296-303, 2015.

〔総説〕(計 2 件)

1. Takano, M., Kawami, M., Aoki A., Yumoto, R.: Receptor-mediated endocytosis of macromolecules and strategy to enhance their transport in alveolar epithelial cells. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 査読有, 12 (5), 813-825, 2015 (invited review) (doi:10.1517/17425247.2015.992778)
2. Takano, M., Kawami, M., and Yumoto, R.: Transport across the cell membrane and its regulation by vesicular transport. *MEMBRANE*, 査読有, 40 (1), 21-28, 2015 (invited review)

〔学会発表〕(計 22 件)

1. 妹尾俊祐, Quercetinによる肺胞上皮II型細胞の薬剤性上皮間葉転換抑制効果とその機構解析, 日本薬学会第138年会, 2018年3月26~28日, 石川県立音楽堂(石川県・金沢市)
2. Harabayashi, R., Role of activating transcription factor 3 in drug-induced epithelial-mesenchymal transition in cultured human alveolar epithelial cells, 32nd JSSX Annual Meeting in Tokyo, 2017年11月29日~12月1日, Tower Hall Funabori (Tokyo)
3. Honda, N., Effect of folic acid and tetrahydrofolic acid on MTX-induced epithelial-mesenchymal transition in A549 cells, 32nd JSSX Annual Meeting in Tokyo, 2017年11月29日~12月1日, Tower Hall Funabori (Tokyo)
4. Harada, R., Association of cell cycle arrest with drug-induced epithelial-mesenchymal transition in A549 cells, 32nd JSSX Annual Meeting in Tokyo, 2017年11月29日~12

- 月 1 日, Tower Hall Funabori (Tokyo)
5. Deguchi, J., The development of new alveolar epithelial cell line and application of this cell line to the study of drug-induced epithelial-mesenchymal transition, 32nd JSSX Annual Meeting in Tokyo, 2017 年 11 月 29 日 ~ 12 月 1 日, Tower Hall Funabori (Tokyo)
 6. Kawami, M., Evaluation of epithelial-mesenchymal transition associated with methotrexate-induced injury in cultured human alveolar epithelial cell line, 第 8 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム, 2017 年 11 月 15 ~ 16 日, 熊本大学 (熊本県・熊本市)
 7. 川見昌史, 肺胞上皮 II 型モデル細胞 RLE/Abca3 における TGF- β 1 誘発性上皮間葉転換に及ぼす新規アデノシン類似化合物 COA-Cl の影響解析, 第 56 回日本薬学会中国四国支部学術大会, 2017 年 10 月 21 ~ 22 日, 徳島大学蔵本キャンパス (徳島県・徳島市)
 8. 山上洋平, 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と細胞外分泌因子の関連解析, 第 56 回日本薬学会中国四国支部学術大会, 2017 年 10 月 21 ~ 22 日, 徳島大学蔵本キャンパス (徳島県・徳島市)
 9. 原田梨紗子, メトトレキサート誘発性肺障害に対する葉酸の防御メカニズムの解析, 日本薬剤学会第 32 年会, 2017 年 5 月 11 ~ 13 日, 大宮ソニックシティ (埼玉県・さいたま市)
 10. 川見昌史, メトトレキサートによる肺胞上皮細胞の上皮間葉転換に及ぼす葉酸の影響解析, 日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月 25 ~ 27 日, 仙台国際センター/東北大学川内地区 (宮城県・仙台市)
 11. 出口純也, 培養肺胞上皮 II 型細胞 RLE/Abca3 における薬剤性障害発症機構の解明とその防御法の開発, 日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月 25 ~ 27 日, 仙台国際センター/東北大学川内地区 (宮城県・仙台市)
 12. 原田梨紗子, メトトレキサート誘発性肺障害に対する葉酸の抑制効果のメカニズム解析, 第 55 回日本薬学会中国四国支部学術大会, 2016 年 11 月 5 ~ 6 日, 就実大学 (岡山県・岡山市)
 13. 本田菜津子, ヒト肺由来 H441 細胞における葉酸トランスポーター RFC の発現とメトトレキサート輸送, 第 55 回日本薬学会中国四国支部学術大会, 2016 年 11 月 5 ~ 6 日, 就実大学 (岡山県・岡山市)
 14. Deguchi, J., Development of strategy to protect TGF- β 1- and drug-induced epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial RLE/Abca3 cells, 31st JSSX Annual Meeting in Matsumoto, 2016 年 10 月 13 ~ 15 日, キッセイ文化ホール (長野県・松本市)
 15. Miyamoto, M., Transport mechanism of methotrexate in human alveolar epithelial cell lines, 31st JSSX Annual Meeting in Matsumoto, 2016 年 10 月 13 ~ 15 日, キッセイ文化ホール (長野県・松本市)
 16. 原林六華, メトトレキサートによる肺胞上皮細胞の上皮間葉転換に対する葉酸の抑制効果, 医療薬学フォーラム 2016/第 24 回 CPS, 2016 年 6 月 25 ~ 26 日, 滋賀県立芸術劇場びわ湖ホール (滋賀県・大津市)
 17. 出口純也, 薬剤による肺胞上皮細胞 RLE/Abca3 の上皮間葉転換とその防御, 日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 27 日 ~ 29 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
 18. 川見昌史, 葉酸トランスポーター RFC によるメトトレキサートの取り込みと肺障害誘発との関連解析, 日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 27 日 ~ 29 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
 19. 原林六華, メトトレキサートによる上皮間葉転換誘発機構の解析とそれに基づく薬剤性肺障害の防御標的の探索, 第 25 回日本医療薬学会年会, 2015 年 11 月 21 日 ~ 23 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
 20. 川見昌史, 肺胞上皮細胞に対するメトトレキサートの障害性と上皮間葉転換の関連解析, 日本薬剤学会創立 30 周年記念シンポジウムおよび第 30 年会, 2015 年 5 月 20 日 ~ 23 日, 長崎ブリックホール (長崎県・長崎市)
 21. 杉本奈津美, ヒト肺上皮由来 H441 細胞におけるペプチドトランスポーター PEPT2 の発現と機能の解析, 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 26 ~ 28 日, 神戸学院大学 (兵庫県・神戸市)
 22. 青木彩子, 新たなマイクロアレイを用いた薬剤性肺障害予測システムの開発, 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 26 ~ 28 日, 神戸学院大学 (兵庫県・神戸市)
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
湯元 良子 (YUMOTO, Ryoko)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究科・准教授
研究者番号: 70379915
 - (2) 研究分担者
なし ()
研究者番号:
 - (3) 連携研究者
高野 幹久 (TAKAN0, Mikihisa)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究科・教授

研究者番号： 20211336

(4)研究協力者

なし ()