

令和元年6月7日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18945

研究課題名(和文)メトトレキサート誘発性肺障害に対する葉酸の有用性の再評価と経肺投与法への応用展開

研究課題名(英文) Investigation on efficacy of folic acid in methotrexate-induced lung injury for development of pulmonary administration of folate

研究代表者

川見 昌史 (Kawami, Masashi)

広島大学・医系科学研究科(薬)・助教

研究者番号：20725775

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：メトトレキサート(MTX)による肺障害に対する葉酸の有用性の評価と経肺投与と製剤としての新たな可能性を見出すことを目的として研究を行った。その結果、MTXによって誘発される肺胞上皮細胞の上皮間葉転換(EMT)は、葉酸の共存によって顕著に抑制され、この葉酸の抑制効果には、MTXによるEMT誘発因子の分泌過程の阻害が関与する可能性が示唆された。さらに、ddyマウスにおいて、葉酸の経肺投与によって、MTXが誘発する肺の炎症が減少する傾向が認められた。これらの知見は、MTX誘発性肺障害に対する葉酸の有用性を示すとともに、葉酸の新たな投与形態の可能性を考える上で重要な基礎的情報となるものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでMTXによる肺障害に対して葉酸製剤の使用は推奨されていなかったが、本研究の成果によって、葉酸はMTXによる肺障害に対して有効である可能性が示された。実際に臨床で用いられてこなかった理由として、MTXと比べて葉酸が肺に移行しにくい可能性も考えられたため、新たに葉酸の経肺投与をMTX誘発性肺障害モデルマウスを用いて検討し、良好な結果がえられつつある。本研究の成果によって、MTX誘発性肺障害に対する葉酸の新規経肺投与製剤が有用である可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Effect of folic acid (FA) and the intratracheal administration on methotrexate (MTX)-induced lung injury was examined. We have found that MTX-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT), which is closely related to pulmonary fibrosis, was completely suppressed by the co-treatment with FA, which effect may be based on an inhibitory effect of FA on increase in secretion of EMT-inducing factors from MTX-treated cells. In mouse models, furthermore, intratracheal administration of FA tended to ameliorate MTX-induced inflammation in the lungs. These findings suggest high efficiency of FA in MTX-induced lung injury, and provide significant basic information to develop novel dosage form of FA in clinical use.

研究分野：生物薬剤学

キーワード：薬剤性肺障害 メトトレキサート 葉酸製剤 上皮間葉転換 肺胞上皮細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

薬剤性肺障害は、薬物によって誘発される重篤な肺疾患であり、間質性肺炎や肺線維症へと進展することから臨床上問題となっている。近年、肺線維症の病態形成には、障害を受けた肺胞上皮細胞から筋線維芽細胞への形質転換である EMT (epithelial-mesenchymal transition) の関与が示唆されているが、薬剤誘発性肺障害における EMT の関連性については十分に検討されていないのが現状である。

一方、肺障害を誘発する頻度が高いとされているメトトレキサート (MTX) は、葉酸代謝拮抗薬として臨床で汎用される薬物である。MTX は、抗がん作用や抗リウマチ作用など幅広い薬理効果を有するが、いくつかの重篤な副作用を誘発する。その中で、汎血球障害や消化管障害のような副作用に対しては、葉酸がレスキューとして用いられるが、MTX 誘発性肺障害に対する葉酸の使用に関する情報は乏しい。葉酸のレスキュー治療は、MTX を用いた治療継続に大きく寄与するものであるが、MTX 誘発性肺障害に対する葉酸の使用が推奨されていない詳細な理由は不明である。

肝臓や腎臓と比べて、肺における薬物の輸送に関する研究は大きく遅れており、MTX や葉酸などの薬物がどのようにして肺へと移行しているのかについては十分な情報がない。MTX による肺障害の誘発には、MTX の肺への移行が重要であると考えられるが、仮に投与した葉酸製剤が肺へと十分に移行しなかった場合、MTX による肺障害を防御できないことが可能性の一つとして考えられる。すなわち、薬物分布の観点から、MTX 誘発性肺障害に対する葉酸の効果が得られない事象が生じている場合、直接葉酸を肺へと投与する経肺投与法が有用な手段であると推測されるが、それらを検証した事例や先行研究は存在しない。

2. 研究の目的

本研究では、肺障害の頻度が比較的高いにも関わらず詳細が明らかにされていない MTX 誘発性肺障害に対する葉酸の有用性の評価を行うことを目的に検討を行った。特に、薬剤誘発性肺障害と EMT の関係性における情報が欠如していることから、肺胞上皮細胞における MTX 誘発性 EMT に対する葉酸の影響解析に焦点を当てた。また、MTX の肺胞上皮細胞への取り込み機構を評価することによって、MTX が肺胞へと移行する過程について明らかにすることも目的とした。さらに、実際に MTX 誘発性肺障害モデル動物を作出し、葉酸の経肺投与の有用性についても検討した。葉酸の経肺投与は、MTX の全身での主効果への影響を最小限に抑えた上で、肺胞上皮のみに生じる MTX 障害を防御できる可能性を有するため、新たな葉酸製剤の創出に大きく貢献しうるものである。

3. 研究の方法

(1) 肺胞上皮細胞における MTX 誘発性 EMT の評価と葉酸の影響解析: ヒト由来培養肺胞上皮細胞 A549 に、葉酸の共存・非共存下において MTX を処置した。EMT 様の形態変化は、位相差顕微鏡を用いて観察した。また、EMT のマーカー遺伝子である α -smooth muscle actin (α -SMA) やその他 EMT 関連遺伝子の mRNA 発現は、real-time PCR や Toray 3D Gene を用いたマイクロアレイによって解析した。さらに、 α -SMA のタンパク質発現は、flow cytometry によって検出した。

(2) MTX による EMT 誘発因子の分泌に及ぼす葉酸の影響解析: A549 細胞に葉酸の共存・非共存下で MTX を処置後、培養上清を回収した。回収した培養上清から透析によって MTX を除去後、凍結乾燥を経て得た粉末を再度培養液に懸濁し、サンプルとした。各処置条件下から得た Conditioned medium (CM) を新たに用意した A549 細胞に暴露し、EMT 形質の評価を行った。

(3) MTX 誘発性 EMT における葉酸代謝サイクルの影響解析: A549 細胞に MTX の薬理効果の標的である dihydro folate reductase (DHFR) の siRNA を導入し、DHFR をノックダウンした後、MTX を処置による EMT 形質変化について評価した。また、MTX をポリグルタミン酸化する酵素である folypolyglutamate synthase (FPGS) に対する siRNA も作成し、FPGS をノックダウン後、MTX を処置し、同様に EMT の評価を行った。

(4) MTX 誘発性 EMT と細胞周期の関連解析: 以下の3つの手法にて細胞周期と MTX 誘発性 EMT の関連性について解析を行った。

A549 細胞に MTX を処置後、細胞を回収した後、固定・膜透過処理を行い、 α -SMA の一次抗体で抗原抗体反応を行った。その後、FITC 標識した二次抗体の反応後、核に集積する propidium iodide (PI) を処置した。染色後の細胞を回収し、flow cytometry を用いて PI を指標にして細胞周期の評価を、FITC を指標にして EMT の評価を同時に解析した。

A549 細胞に MTX を処置後、細胞を回収し、Hoechst33342 と反応後、セルソーターを用いて、細胞を G1、S および G2/M 期の細胞にそれぞれ分取した。分取した細胞から total RNA を抽出し、逆転写反応を経て生成した cDNA を用いて、 α -SMA の mRNA 発現レベルを real-time PCR を用いて行った。

A549 細胞を、チミジンを用いて S 期に、ノコダゾールを用いて G2/M 期に同調後、MTX をそれぞれの細胞に処置し、 α -SMA の mRNA 発現レベルを real-time PCR によって解析した。

(5) 肺上皮細胞における MTX の取り込み機構に及ぼす葉酸の影響解析: A549 細胞およびヒト由来培養肺胞上皮細胞 H441 を用いて、 $[^3\text{H}]$ MTX の取り込みの評価を行った。細胞内に取り込まれた $[^3\text{H}]$ MTX は液体シンチレーションカウンタによって検出した。また、葉酸トランスポーターとして知られる reduced folate carrier (RFC) に対する抗体を用いて、A549 および H441 細胞における RFC のタンパク質発現量を western blot によって解析した。さらに、H441 細胞における RFC の局在を決定するため、H441 細胞を固定・膜透過処理後、Hochst33342 を用いて核を、RFC 抗体および FITC 標識二次抗体を用いて RFC を染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析を行った。

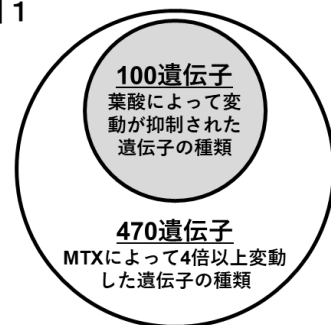
(6) MTX 誘発性肺障害モデルマウスの作出と葉酸の経肺投与の影響解析: ddy マウスに対して 10 mg/kg の MTX を 5 日間腹腔内投与し、最初の投与から 7 日目に肺を単離した。また、葉酸の投与は、MTX 投与の初日に行い、microsprayer を用いて経肺投与を行った。単離した肺組織のホモジネート中の malondialdehyde (MDA) を発色させ、吸光波長 560 nm で検出・定量した。

4. 研究成果

(1) A549 細胞における MTX の EMT 誘発と葉酸の防御効果

A549 細胞に MTX を処置したところ、EMT 様の紡錘状の形態変化と α -SMA の mRNA およびタンパク質発現の上昇が認められた一方、葉酸の共存によってこれら変化は顕著に抑制された。(発表論文 3) また、マイクロアレイ解析によって、MTX によって発現が変動する遺伝子および葉酸によってその変動が抑制される遺伝子の網羅的な解析を行った。その結果、図 1 に示すように、MTX によって 4 倍以上変動する遺伝子として 470 種類を特定したが、そのうち 100 遺伝子は葉酸の共存によって、MTX による発現変動が抑制された。これら 100 種類の遺伝子セットを用いてパスウェイ解析を行ったところ、当該遺伝子セット中に細胞周期をアノテーション情報として有する遺伝子が統計的に多く含まれていることが明らかになった。

図 1

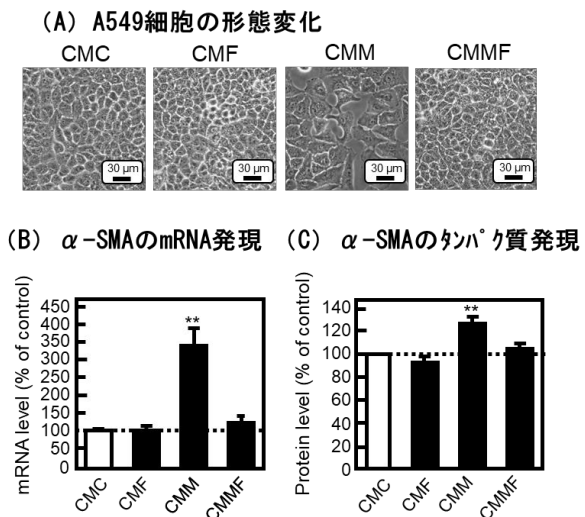


マイクロアレイ解析によって得られた遺伝子発現変動解析の結果

(2) MTX による EMT 誘発因子の分泌に及ぼす葉酸の影響解析

MTX は様々な因子の分泌を促進し、その中には IL-6 など、EMT を誘発するサイトカインなども含まれている。そこで、MTX によって分泌される種々の因子が MTX 誘発性 EMT に関与するか否かについて検討を行った。MTX を処置後、回収した培養上清から MTX を透析によって除去することによって得た CM (CMM) を新たに用意した A549 細胞に暴露したところ、図 2 に示すように EMT 様の形態変化および α -SMA の mRNA およびタンパク質発現の上昇が認められた。従って、MTX は、何らかの EMT 誘発因子の分泌を亢進することによって EMT を誘発している可能性が示された。一方、MTX と葉酸を共存処置した後、同様に調製した CM (CMMF) の場合、CMM による EMT 様の形質変化が抑制された(図 2) ことから、葉酸は MTX による EMT 誘発因子の分泌過程の阻害を介して、MTX 誘発性 EMT を抑制している可能性が示唆された。(発表論文 3)

図 2



(A) 位相差顕微鏡による A549 細胞の形態画像、(B) real-time PCR による α -SMA の mRNA 発現解析 (n=3)、(C) flow cytometry による α -SMA のタンパク質発現解析 (n=3)、**p<0.01, vs CMC
CMC: Control 細胞から得た CM、CMF: FA 処置細胞から得た CM、CMM: MTX 処置細胞から得た CM、CMMF: MTX+FA 処置細胞から得た CM

(3) MTX 誘発性 EMT に対する葉酸代謝サイクルの影響解析

MTX 誘発性 EMT に対する葉酸の強力な阻害効果が明らかになったことから、次に MTX 誘発性 EMT に対する葉酸代謝サイクルの影響について検討を行った。まず、葉酸から葉酸代謝サイクルに必要なテトラヒドロ葉酸を生成する酵素である DHFR に焦点を当てた。A549 細胞に DHFR に対する siRNA を導入し、DHFR をノックダウン後、MTX の処置を行ったところ、興味深いことに MTX による EMT の誘発に影響は認められなかった。従って、MTX の薬理効果の標的である DHFR は、MTX 誘発性 EMT に関与しない可能性が示唆された。一方、DHFR ノックダウン細胞において、葉酸の MTX 誘発性 EMT に対する防御効果が減少した。また、葉酸と比べてテトラヒドロ葉酸の方が低濃度で MTX による EMT の誘発を阻害したため、葉酸の EMT 抑制効果において DHFR が重要な役割を担う可能性も示唆された。

(4) MTX 誘発性 EMT に対する細胞周期の影響解析

MTX を処置した A549 細胞におけるマイクロアレイおよびパスイエイ解析の結果から、細胞周期が MTX 誘発性 EMT に関与するとの結果が得られたことから、EMT の誘発と細胞周期の関連性に着目して検討を行った。まず、MTX を処置した細胞に PI および α -SMA に対する一次抗体・FITC 標識二次抗体を処置し、flow cytometry を用いて PI および FITC を同時に検出したところ、MTX によって細胞周期は S 期に停止したと、および G1 期と比べて S および G2/M 期で α -SMA のタンパク質発現が亢進していることを見出した。次に、MTX を処置した細胞に Hoechst33342 を取り込ませた後、セルソーターを用いて細胞周期毎に細胞を分取し、それぞれの細胞群から抽出した total RNA を用いて α -SMA の mRNA 発現レベルを確認した。その結果、flow cytometry の結果と同様に、G1 期と比べて、S および G2/M 期における α -SMA の mRNA 発現レベルが有意に高いことが明らかになった(図 3)。さらに、細胞周期停止薬であるチミジンおよびノコダゾールを処置することによって細胞を S および G2/M 期に停止させた後、MTX を処置したところ、両細胞周期停止薬による α -SMA の mRNA 発現の増加と比べて、さらなる発現レベルの上昇は認められなかった。これらの結果から、MTX 誘発性 EMT は、細胞周期の停止(主に S および G2/M 期)と関連する可能性が示唆された。また、チミジンやノコダゾールでも α -SMA の mRNA 発現レベルは上昇したことから、MTX のみならず細胞周期の停止を促す薬物であれば、EMT を誘発し、ひいては肺障害を呈する可能性があるものと考えられる。

(5) 肺胞上皮細胞における MTX の取り込み機構の解析

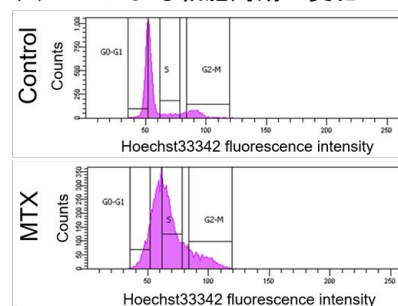
ヒト由来肺胞上皮細胞である A549 および H441 細胞における MTX の取り込み機構の解析を行った。まず、A549 細胞において、MTX の取り込みには、pH 5.5 では proton coupled folate transporter (PCFT) が、pH 7.4 では RFC が主に関与することを明らかにし、生理条件を考慮した場合、肺への移行には主に RFC が関与すると考え、RFC に着目した。A549 細胞における MTX の取り込みに対する葉酸の K_i 値は Dixon plot から 273.1 μ M と算出され、RFC に対する親和性は MTX (K_m 値; 1.52 μ M) と比べて低い可能性が示唆された。すなわち、RFC が MTX の肺への移行に関与する場合、葉酸と比べて MTX は肺に移行しやすいことが推測される。そこで、比較的高い極性を有する H441 細胞を用い、MTX 取り込みの方向性について検討を行った。まず、transwell の insert 上に H441 細胞を播種し、13 日間培養後、十分な膜電気抵抗値を得たことを確認し、MTX を apical 側あるいは basal 側から暴露したところ、30 分後の細胞内取り込みは、basal 側から暴露した方が、apical 側と比べて有意に高かった(図 4A)。さらに、H441 細胞における RFC の局在について共焦点レーザー顕微鏡を用いて確認したところ、RFC は basal 側に局在している可能性が示唆された(図 4B)。これらのことから、MTX は basal 側に局在する RFC によって肺胞上皮細胞へと移行し、RFC への親和性が低い葉酸は MTX と比べて肺に移行しにくい可能性も併せて示唆された。(発表論文 1)

(6) MTX 誘発性肺障害モデルマウスに対する葉酸の経肺投与の影響解析

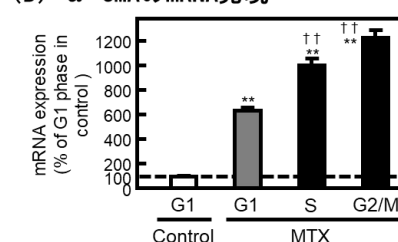
MTX を ddy マウスに 10 mg/kg の量で 5 日間腹腔内投与を行い、7 日目に肺を単離したところ、炎症の指標である MDA の産生レベルの上昇が認められた。そこで、MTX の投与前に microsprayer を用いて葉酸の経肺投与を行い、生理食塩水の経肺投与の場合と比較した。その結果、葉酸の経肺投与によって、MTX による MDA の上昇が抑制される傾向が認められた。本結果については更なる再現性の検討が必要であると考えているが、in vivo で葉酸の経肺投与の有効性が認められた初めての事例である。

図 3

(A) MTX による細胞周期の変化



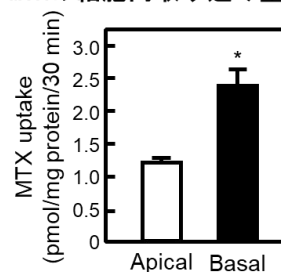
(B) α -SMA の mRNA 発現



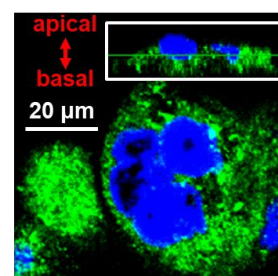
(A) Hoechst33342 を指標とした MTX による細胞周期の変化と分取細胞の領域、(B) real-time PCR による α -SMA の mRNA 発現解析 (n=3)、**p<0.01, vs G1 in Control、††p<0.01, vs G1 in MTX

図 4

(A) MTX の細胞内取り込み量



(B) RFC の細胞内における局在



(A) Apical および Basal 側からの MTX の取り込み量の評価 (n=3)、*p<0.01, vs Apical (B) RFC の局在の解析、緑: RFC、青: 核

本研究で得られた結果を以下にまとめる。

- ✓ A549 細胞において MTX が誘発する EMT 様の形態変化および EMT マーカー α -SMA の mRNA およびタンパク質発現の上昇を葉酸は顕著に抑制した。
- ✓ 葉酸の EMT 抑制効果には、MTX による EMT 誘発因子の分泌過程の阻害が関与し、さらに DHFR によるテトラヒドロ葉酸への変換が重要である可能性が示唆された。
- ✓ MTX 誘発性 EMT には、細胞周期の停止が関与する可能性が示唆された。
- ✓ MTX は肺胞上皮細胞に RFC を介して basal 側から取り込まれる可能性が示唆された。さらに、葉酸の RFC に対する親和性が MTX と比べて低いため、葉酸は MTX よりも肺へと移行しにくい可能性が考えられた。
- ✓ MTX 誘発性肺障害モデルマウスにおいて、葉酸の経肺投与は有用である可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Kawami M, Honda N, Miyamoto M, Yumoto R, Takano M: Reduced folate carrier-mediated methotrexate transport in human distal lung epithelial NCI-H441 cells, *J Pharm Pharmacol*, 2019, 71:167-175, 査読有, doi: 10.1111/jphp.13022.
2. Kawami M, Shimonakamura T, Yumoto R, Takano M: Transport of AOPP-albumin into human alveolar epithelial A549 cell, *J Pharm Pharm Sci*, 2018, 21:247-255, 査読有, doi: 10.18433/jpps29905.
3. Kawami M, Harabayashi R, Harada R, Yamagami Y, Yumoto R, Takano M: Folic acid prevents methotrexate-induced epithelial-mesenchymal transition via suppression of secreted factors from the human alveolar epithelial cell line A549, *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 497:457-463, 査読有, doi: 10.1016/j.bbrc.2018.02.111.
4. Takano M, Kamei H, Nagahiro M, Kawami M, Yumoto R: Nicotine transport in lung and non-lung epithelial cells, *Life Sci*, 2017, 188:76-82, 査読有, doi: 10.1016/j.lfs.2017.08.030.
5. 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 Metabolism Pharmacokinetics*, 2017, 32:224-227, 査読有, doi: 10.1016/j.dmpk.2017.05.001
6. 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*, 2017, 106:2868-2872, 査読有, doi: 10.1016/j.xphs.2017.04.002.
7. 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*, 2016, 194:923-930, 査読有, <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00408-016-9935-7>

〔学会発表〕(計 21 件)

1. 川見昌史, 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, 日本薬学会第 139 年会, 2019 年 3 月 20-23 日
2. Masashi Kawami, In vitro study on secreted factors associated with drug-induced epithelial-mesenchymal transition in A549 cells, The 1st Workshop of The Research Center for Drug Development and Biomarker Discovery, 2019 年 3 月 2 日
3. 原拓也, 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, 第 57 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, 2018 年 11 月 10-11 日
4. 小島崇路, 肺胞上皮細胞における薬物誘発性上皮間葉転換と細胞周期の関連解析, 第 57 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, 2018 年 11 月 10-11 日
5. 川見昌史, 薬剤性肺障害の発症機構解明とその防御法に関する研究, 第 57 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, 2018 年 11 月 10-11 日
6. Yohei Yamagami, Role of plasminogen activator inhibitor-1 in methotrexate-induced epithelial-mesenchymal transition in cultured human alveolar epithelial A549 cells, 2018 International Meeting on 22nd MDO and 33rd JSSX, 2018 年 10 月 1-5 日
7. Ayano Yamamoto, Role of miR-34a and p53 pathway in drug-induced epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells, 2018 International Meeting on 22nd MDO and 33rd JSSX, 2018 年 10 月 1-5 日
8. Masashi Kawami, Study on association of drug-induced cell cycle arrest with epithelial-mesenchymal transition in A549 cells, 2018 International Meeting on 22nd

- MDO and 33rd JSSX, 2018年10月1-5日
9. 川見昌史, 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, 日本薬剤学会第 33 年会, 2018 年 5 月 30 日-6 月 1 日
 10. Risako Harada, Association of cell cycle arrest with drug-induced epithelial-mesenchymal transition in A549 cells, 日本薬物動態学会第 32 回年会, 2017 年 11 月 29 日-12 月 1 日
 11. Natsuko Honda, Effect of folic acid and tetrahydrofolic acid on MTX-induced epithelial-mesenchymal transition in A549 cells, 日本薬物動態学会第 32 回年会, 2017 年 11 月 29 日-12 月 1 日
 12. Rika Harabayashi, Role of activating transcription factor 3 in drug-induced epithelial-mesenchymal transition in cultured human alveolar epithelial cells, 日本薬物動態学会第 32 回年会, 2017 年 11 月 29 日-12 月 1 日
 13. 山本彩乃, 肺胞上皮細胞における薬物誘発性上皮間葉転換に及ぼす miR-34a の影響解析, 第 56 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, 2017 年 10 月 21-22 日
 14. 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・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会, 2017 年 10 月 21-22 日
 15. 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-CI の影響解析, 第 56 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, 2017 年 10 月 21-22 日
 16. 原田梨沙子, 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
 17. 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
 18. 原田梨沙子, 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・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会, 2016 年 11 月 5-6 日
 19. 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・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会, 2016 年 11 月 5-6 日
 20. Mioka Miyamoto, Transport mechanism of methotrexate in human alveolar epithelial cell lines, 日本薬物動態学会第 31 回年会, 2016 年 10 月 13-15 日
 21. 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 回クリニカルファーマシーシンポジウム, 2016 年 6 月 25-26 日

6. 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
研究協力者氏名：高野 幹久
ローマ字氏名：(TAKAN0, Mikihisal)

研究協力者氏名：湯元 良子
ローマ字氏名：(YUMOTO, Ryoko)