

令和元年6月20日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21371

研究課題名(和文)メトトレキサート誘発肺障害発症におけるOATP4C1の臨床応用研究

研究課題名(英文)Involvement of OATP4C1 in the development 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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では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メトトレキサート(MTX)による薬剤性肺障害に着目した。MTXの輸送を担うOATP4C1は肺胞上皮細胞に発現し、MTXによる細胞障害に寄与していることが示された。また、OATP4C1を介したMTXの細胞の蓄積が細胞形態変化や遊走能の獲得などのEMTを促すことが示された。MTX誘発肺障害患者の肺胞上皮細胞に発現するOATP4C1が肺障害発症に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺胞上皮細胞に発現するOATP4C1が輸送を担う医薬品による薬剤性肺障害発症機序の解明につながり、将来、OATP4C1の薬剤性肺障害の新たな治療方法の開発や副作用を予測するバイオマーカーとなりつつ可能性を秘めていることが特色である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on drug-induced lung injury caused by methotrexate (MTX), a drug for rheumatoid arthritis that has been used in clinical practice and has reported adverse effects on lung injury. It was shown that OATP4C1, which is responsible for MTX transport, is expressed in alveolar epithelial cells and contributes to MTX-mediated cell injury. Moreover, it was shown that accumulation of MTX cells via OATP4C1 promotes EMT such as cell shape change and acquisition of migration ability. It was suggested that OATP4C1 expressed in alveolar epithelial cells of patients with MTX-induced lung injury may contribute to the onset of lung injury.

研究分野：医療薬学

キーワード：薬剤性肺障害 OATP4C1 肺胞上皮細胞 EMT 薬物トランスポーター

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、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。しかし、薬剤性肺障害発症過程における肺胞上皮細胞の障害が重要であるが、肺胞上皮細胞に特異的に発現する薬物トランスポーターと薬剤性肺障害発症機序に関する報告は乏しい。

2. 研究の目的

本研究では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 メトトレキサート (MTX) による薬剤性肺障害に着目した。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、患者を致死的状态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。MTX の輸送を担う薬物トランスポーター (ABC トランスポーター 9 種類、Slc トランスポーター 15 種類) の発現を肺胞上皮細胞と肺線維芽細胞間で比較した結果、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、肺胞上皮細胞は Mrp3、Organic anion transporting polypeptide (OATP) 4C1 の発現が有意に高いことを報告した。さらに細胞内への MTX の取り込み能は有意に肺胞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。OATP4C1 を介した肺胞上皮細胞内への 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。

また、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ている。MTX 誘発肺線維化モデル動物において、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。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 陽性細胞が共同存在していることが明らかとなった。以上のことから、MTX 誘発肺線維化発症過程における線維化巣に過剰増殖する筋線維芽細胞の供給源の 1 つであることを報告した。

また、OATP4C1 は主に腎臓と肺に発現すると報告されている。特に腎臓における OATP4C1 の局在については、腎尿細管の頂端膜又は基底膜側にすると報告がある一方、肺においては蛋白質レベルでの発現やその局在、役割についての報告は乏しく、肺線維化発症との関係は不明な点が多い。

そこで、これまでの基礎研究の成果である薬剤性肺障害発症機序における肺胞上皮細胞に発現する OATP4C1 の更なる機能解析を行いつつ、臨床応用に向けて薬剤師肺障害発症機序における薬物トランスポーターの役割を明らかにすることは臨床上極めて重要であると考えている。

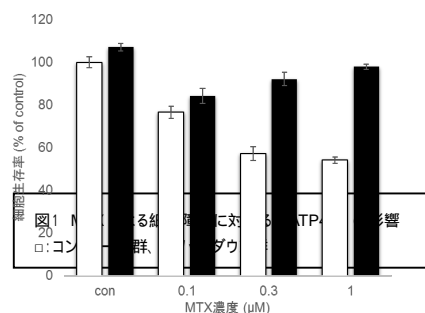
3. 研究の方法

- (1) 使用細胞
培養肺胞上皮細胞として、ヒト肺腺癌由来 A549 細胞を用いた。
- (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 を導入することで OATP4C1 発現抑制モデルを作製した。OATP4C1 の発現量は 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。
- (3) Wound healing assay 法
OATP4C1 siRNA 処置および未処置した A549 細胞を 6 穴プレートに 5×10^4 cells/mL で播種し、コンフルエントまで培養した。スクレーパーで細胞の一部を剥離した後、MTX 1 μ M を処置し、24 時間後に位相差顕微鏡にて観察し、細胞形態変化および遊走能を評価した。遊走した面積は、Image J を用いて解析を行った。
- (4) ヒト肺組織ならびに肺胞上皮細胞における OATP4C1 の発現とその局在
MTX 誘発肺線維化患者のパラフィン包埋した肺組織切片および肺胞上皮細胞を用いて、線維化の指標となる OATP4C1 の発現とその局在を免疫組織化学染色法にて検討する。ヒト肺組織においては健常者ならびに同一患者内の正常部位と線維化巣に注目して比較検討を行う。

4. 研究成果

- (1) MTX による細胞障害に対する OATP4C1 の影響

A549 細胞に siRNA を導入し、OATP4C1 発現抑制モデルを作成した。OATP4C1 ノックダウン群とコントロール群を用いて MTX による細胞障害に対する OATP4C1 の影響を検討した。コントロール群は MTX 0.1-1 μM 添加 72 hr 後の細胞生存率は濃度依存的に低下し、MTX 1 μM 添加時に約 50% を示した。一方、ノックダウン群では、MTX による細胞障害が軽減することが示された(図 1)。このことから、MTX が OATP4C1 を介した細胞内への取り込みが細胞障害に寄与している可能性が示された。



(2) MTX による細胞形態変化および遊走能に対する OATP4C1 の影響

ノックダウン群とコントロール群を用いて MTX による遊走能への影響を検討した。各細胞を 6 穴プレートにコンフルエントになるまで培養し、スクレーパーで一部を除去した後と MTX 1 μM 添加 24 時間後に位相差顕微鏡にて観察を行い、細胞が遊走した面積を image J にて定量解析を行った。その結果、コントロール群は MTX 処置により、遊走能が亢進したがノックダウン群では顕著な亢進は認められなかった。また、遊走した細胞の形態を比較したところ、コントロール群では MTX 処置により敷石状から紡錘体状への顕著な細胞形態変化が認められたことから、ノックダウン群と比べて EMT が生じていることが示唆された。

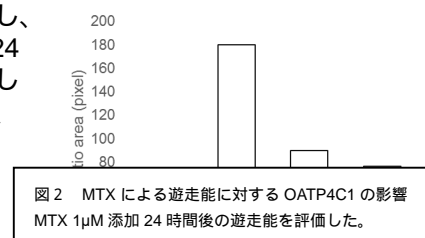


図 2 MTX による遊走能に対する OATP4C1 の影響
MTX 1 μM 添加 24 時間後の遊走能を評価した。

(3) A549 細胞における OATP4C1 の局在を検討

蛍光免疫染色の結果、OATP4C1 が細胞膜の basolateral 側に発現していることが示唆された。以上のことから肺胞間質に存在する血管から MTX が肺胞上皮細胞の基底膜側に存在する OATP4C1 から取り込まれ、細胞障害が生じる可能性が考えられた。さらに詳細について検証し、明らかにしていきたい。

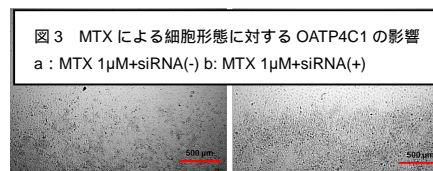


図 3 MTX による細胞形態に対する OATP4C1 の影響
a : MTX 1 μM +siRNA(-) b: MTX 1 μM +siRNA(+)

(4) ヒト肺組織における OATP4C1 の発現とその局在

MTX 誘発肺線維化患者のパラフィン包埋した肺組織切片を用いて、線維化の指標となるコラーゲンの蓄積、炎症性細胞の浸潤、筋線維芽細胞の局在および OATP4C1 の発現を免疫組織化学染色法にて評価し、健康者ならびに同一患者内の正常部位と線維化巣を比較することで OATP4C1 の MTX 誘発肺線維化への影響を検討する予定であった。しかし、研究期間内に購入予定であった OATP4C1 の 1 次抗体が国内外にて製品の品質管理の問題で急遽製造中止になり、入手不可能になったため、組織免疫染色に関する研究計画が大幅に遅延してしまった。現在、代替の新たな抗体を入手し、実験条件を検討した上で、ヒト肺組織における OATP4C1 の発現とその局在ならびに健康者と肺線維化患者における OATP4C1 の発現量と肺線維化の発症との関係について引き続き解析を行う予定である。

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、MTX が OATP4C1 によって細胞内へ取り込まれ、障害を受けることによって肺胞腔内で炎症が助長し、肺胞壁の肥厚の起点になることが示唆された。さらに MTX により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、肺線維化の悪化に寄与する可能性が考えられた。今後は、臨床応用に向けてヒト肺組織を用いて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年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、薬物トランスポーターが新たなバイオマーカーになることを目指して検討していきたい。

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 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、日本薬学会年会 137 年会、2017 年 3 月(仙台)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8 桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。