

平成 30 年 5 月 2 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293033

研究課題名(和文) 薬剤性肺線維症の分子機構解明とその予測法・防御法の開発

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanism of drug-induced lung fibrosis and development of strategy to predict and prevent the fibrosis

研究代表者

高野 幹久 (Takano, Mikihisa)

広島大学・医歯薬保健学研究科(薬)・教授

研究者番号：20211336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：薬物の肺障害性について、重篤な肺の線維化と深く関係する肺胞上皮細胞の上皮間葉転換(EMT)の観点から研究を行った。その結果、メトトレキサートなどの肺障害性薬物は、肺胞上皮細胞に直接作用しEMTを引き起こすこと、EMTの誘発にはSmad2のリン酸化、細胞外分泌因子、マイクロRNAなど様々な因子が関与すること、サプリメントとしても使用されているケルセチンはEMT抑制効果を持つことなどを明らかにした。これらの知見は、薬剤性肺障害の分子機構の理解や肺障害防御法の開発に有用と考える。

研究成果の概要(英文)：Mechanisms underlying drug-induced pulmonary injury were investigated from the viewpoint of epithelial-mesenchymal transition (EMT) of alveolar epithelial cells deeply related to pulmonary fibrosis. We have found that (1) drugs such as methotrexate act directly on alveolar epithelial cells to cause EMT, (2) various factors such as Smad2 phosphorylation, extracellular secretion factor, and microRNA are involved in the induction of EMT by drugs, (3) quercetin which is used as a supplement in Japan has been shown to have EMT inhibitory effect. These findings would be useful for understanding the molecular mechanisms of drug-induced lung injury and developing strategies for preventing pulmonary disorders.

研究分野：生物薬剤学

キーワード：薬剤性肺線維症 肺胞上皮 型細胞 上皮間葉転換 メトトレキサート プレオマイシン マイクロRNA
ケルセチン

1. 研究開始当初の背景

間質性肺炎などの薬剤性の肺障害は重篤な副作用であり、特に病態の進行によって肺組織が線維化した肺線維症は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。間質性肺炎や肺線維症は、プレオマイシン (BLM)、ニトロソウレア系、さらには分子標的薬ゲフィチニブなどの各種抗がん剤や抗てんかん剤など多種多様な薬剤によって引き起こされるが、障害発症機構には不明な点が多い。また、肺線維症の治療には一般にステロイドが使用されるが、その効果は十分ではない。筋線維芽細胞は、肺の線維化に中心的な役割を果たしているが、近年、その由来として肺胞上皮 II 型細胞の筋線維芽細胞への転換(上皮間葉転換; Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT)) が注目されている。一方、特発性肺線維症 (Idiopathic Pulmonary Fibrosis) の進行には、TGF- β 1 が重要な役割を担っていることが知られている。こうした経緯から、培養肺胞上皮細胞を用いて TGF- β 1 による EMT の誘発に関する研究が開始された。現在、複数の研究グループが、TGF- β 1 処置によって細胞形態の変化や遺伝子発現の変化が生じること、これら変化は EMT と関連する可能性があることを報告しつつあるが、薬剤性肺障害と EMT の関係は明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では、肺胞上皮細胞を用い、薬物による EMT の誘発やその分子機構について細胞レベル・分子レベルで解析するとともに、EMT を検出するためのバイオマーカーを明らかにすることを第一の目的とする。次に、治療薬・予防薬の開発に向け、EMT を抑制する化合物・薬物を探索・同定することを第二の目的とする。

3. 研究の方法

(1) TGF- β 1 や肺障害性薬物による上皮細胞の EMT 様形態変化の観察: 培養肺胞上皮細胞を TGF- β 1 や BLM、メトトレキサート (MTX) などの肺障害性薬物で処置し、上皮細胞から間葉系細胞 (筋線維芽細胞) への形態変化を位相差顕微鏡で観察した。また、EMT が生じるとアクチンフィラメントのリモデリングが起こるので、BODIPY FL phalloidin でアクチンフィラメントを染色し共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(2) TGF- β 1 や肺障害性薬物による肺胞上皮細胞の遺伝子 (mRNA およびマイクロ RNA) 発現変化の解析: (1) で細胞形態に変化が見られた処置条件を用い、各種 mRNA 発現について real-time PCR によって解析した。対象とする mRNA は、上皮細胞及び II 型細胞マーカーとして Cytokeratin 19、E-cadherin、Zonula occludens 1、ABCA3 など、筋線維芽細胞マーカー遺伝子として α -Smooth muscle

actin、Collagen type I、Connective tissue growth factor など、TGF 関連遺伝子として TGF- β 1、TGF receptorなどを細胞に応じて適宜選択した。また、マイクロ RNA の発現変化についてもマイクロアレイや real-time PCR によって解析した。

(3) TGF や肺障害性薬物による Smad のリン酸化変化の解析: TGF- β 1 による EMT には、Smad 経路が関係するとされるため、肺胞上皮細胞を TGF や肺障害性薬物で処置し、Smad のリン酸化変化について Western blot 法により解析した。

(4) 薬物誘発性 EMT を抑制する化合物の探索・同定: N-アセチルシス테인 (NAC)、アスコルビン酸、ケルセチン、ピルフェニドンなど、これまでの情報から TGF- β 1 誘発性 EMT を抑制する可能性のある化合物を選択し、薬物誘発性 EMT に対する防御効果を解析した。まず、細胞形態変化に対する防御効果でスクリーニングし、効果の得られた化合物についてさらに mRNA 発現や Smad のリン酸化に対する影響を解析した。

4. 研究成果

(1) RLE/Abca3 細胞の形質に及ぼす TGF- β 1 および肺障害性薬物の影響: ラット由来の RLE-6TN 細胞から我々が樹立した RLE/Abca3 細胞 (Abca3 遺伝子導入によって全体的に II 型形質が高まった細胞) を用い、TGF- β 1 による EMT の誘発について解析した。その結果、TGF- β 1 によって RLE/Abca3 細胞の形態が紡錘状の線維芽細胞様に変化し、またアクチンフィラメントの走行も線維状に変化した。さらに上皮系マーカー遺伝子の発現低下、間葉系マーカー遺伝子の発現上昇が認められ、TGF- β 1 によって EMT が誘発されていることが示された。次に、抗がん剤 BLM および MTX を用いて RLE/Abca3 細胞を処置し、同様の検討を行った。その結果、これら抗がん剤も、TGF- β 1 による EMT と類似した変化を引き起こすことが明らかとなった。なお、TGF- β 1 による EMT に対する特発性肺線維症治療薬ピルフェニドンの影響について検討したが、ピルフェニドンは TGF- β 1 による EMT の抑制効果を示さなかった。従って、ピルフェニドンの抗線維化作用は、肺胞上皮細胞の EMT に対する直接作用ではないものと考えられた。(発表論文 8)

(2) A549 細胞におけるメトトレキサート誘発性 EMT とその分子機構: ヒト由来肺胞上皮 A549 細胞を MTX で処置したところ、EMT 様変化が誘発され、TGF- β 1 処置の場合と同様、Smad2 のリン酸化が亢進した。さらに、TGF- β 1 のシグナル伝達を阻害する SB431542 を MTX と併用したところ、細胞形態や mRNA 発現から見た EMT 様変化や Smad2 のリン酸化が抑制された。しかし、TGF- β 1 の中和抗体を培

養液中に添加しても MTX による EMT 誘発には影響を与えなかった。従って、MTX による EMT 誘発には、TGF- β 1 処置と類似したシグナル伝達経路が関与するが、TGF- β 1 のオートクリンは関与しないものと考えられた。そこでさらに細胞外分泌因子の関与について検討するため、A549 細胞を MTX で処置し、その培養上清を透析して MTX を除去し、Conditioned Medium (CM-MTX) を調製した。A549 細胞を CM-MTX で処置したところ、EMT 様の変化が観察された。従って、MTX による EMT 誘発には上清中に分泌される何らかの因子の関与が示唆された。さらに、細胞を MTX で処置する際に葉酸を併用したところ、CM による EMT 誘発は観察されなかった。また、CM-MTX による EMT 誘発効果も葉酸により抑制された。従って、葉酸は MTX 誘発性肺障害の防御に有用である可能性が示唆された。(発表論文 7)

(3) TGF- β 1 や肺障害性薬物による肺胞上皮細胞の EMT 誘発におけるマイクロ RNA の関与：RLE/Abca3 細胞を TGF- β 1 や BLM で処置しマイクロアレイで解析したところ、miR-34a の発現上昇が認められた。real-time PCR で検証したところ、TGF- β 1、BLM、MTX による miR-34a の発現上昇が確認された。また、miR-34a の標的遺伝子で細胞間接着に関与する Nectin-1 や II 型細胞マーカーである ABCA3 の mRNA およびタンパク質発現の減少が観察された。そこでさらに、miR-34a の mimic を細胞に導入し直接的な効果を検討した。その結果、miR-34a の mimic 導入によって、Nectin-1 および ABCA3 の mRNA 発現が減少することを認めた。従って、miR-34a が EMT に関与する可能性、および EMT の新たなバイオマーカーとなる可能性が示唆された。(発表論文 1)

(4) RLE/Abca3 細胞を用いた薬物誘発性 EMT を抑制する化合物の検討：RLE/Abca3 細胞を用いて細胞形態の変化抑制を指標にスクリーニングを行ったところ、アスコルビン酸およびケルセチンは、TGF- β 1、MTX、BLM による EMT 様の細胞形態変化を顕著に抑制したことから、肺線維症抑制物質として有望と考えられた(図 1)。そこでケルセチンに焦点を当ててさらに検討を行ったところ、ケルセチンは TGF- β 1、MTX、BLM による間葉系マーカー α -SMA の mRNA およびタンパク質の発現上昇抑制効果を持つことが明らかとなり、EMT マーカー発現の面からもケルセチンの EMT 抑制効果が示された。さらに、ケルセチンはリン酸化 Smad2 の上昇を抑制すること、また EMT 抑制効果との関係は現在のところ明確でないが、TGF- β 1、BLM による ROS 産生も抑制することを見出した。従ってケルセチンは、薬剤性肺障害の防御に有用な化合物である可能性が示唆された。

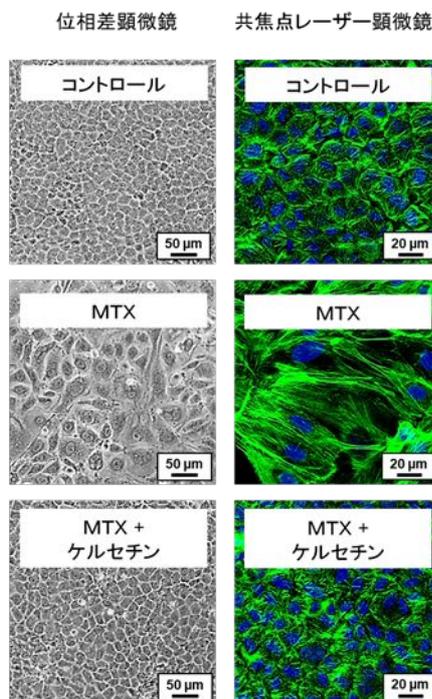


図1 MTXによる細胞形態のEMT様変化とケルセチンによる防御効果(共焦点レーザー顕微鏡観察はアクチンフィラメントを染色して行った)

これらの結果は、薬剤性肺障害、特に肺線維症発症の分子機構について新たな知見を提供するものであり、関連領域の研究推進に対する貢献は大きい。さらに今後ケルセチンによる薬剤性肺障害防御作用を *in vivo* でも検証できれば、臨床への応用も期待できるため、医療上も価値のある成果と考えている、

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 11 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-CI 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. Takano, M., Nagahiro, M., Yumoto, R.: Transport mechanism of nicotine in primary cultured alveolar epithelial cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 査読有, 105, 982-988, 2016 (doi: 10.1002/jps.24627)
 6. 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)
 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*, 査読有, 194, 923-930, 2016 (doi:10.1007/s00408-016-9935-7)
 8. 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)
 9. 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)
 10. 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).
 11. 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, うち招待 3 件)
1. 高野幹久, 肺胞上皮における薬剤性細胞障害の発症メカニズム・予測・防御, 日本薬学会北陸支部, 2017年6月9日, 富山大学杉谷キャンパス(富山県・富山市)(招待)
 2. 高野幹久, 薬物の生体膜輸送と細胞毒性研究, 第11回 次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム, 2017年10月21~22日, 京都薬科大学(京都府・京都市)(招待)
 3. Takano, M., Functional expression of PEPT2 and its regulation in alveolar epithelial cells, 22-23 September, 2016, Workshop on Drug Transporters in the Lungs, Trinity College Dublin (Dublin, Ireland) (招待)
 4. 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)
 5. 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 Matsumoto, 2017年11月29日~12月1日, Tower Hall Funabori (Tokyo)
 6. Honda, N., Effect of folic acid and tetrahydrofolic acid on MTX-induced epithelial-mesenchymal transition in A549 cells, 32nd JSSX Annual Meeting in Matsumoto, 2017年11月29日~12月1日, Tower Hall Funabori (Tokyo)
 7. Harada, R., Association of cell cycle arrest with drug-induced

- epithelial-mesenchymal transition in A549 cells, 32nd JSSX Annual Meeting in Matsumoto, 2017年11月29日～12月1日, Tower Hall Funabori (Tokyo)
8. 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 Matsumoto, 2017年11月29日～12月1日, Tower Hall Funabori (Tokyo)
 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. 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)
 13. 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)
 14. 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)
 15. 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)
 16. 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)
 17. 川見昌史, 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)
 18. Yumoto, R: Effect of cigarette smoke extract on PEPT2 function in alveolar epithelial cells, JSSX-ISSX Joint Meeting, Oct. 18-23, 2014, San Francisco (USA).
 19. Nagahiro, M., Transport of nicotine, an organic cation, in alveolar epithelial cells, JSSX-ISSX Joint Meeting, Oct. 18-23, 2014, San Francisco (USA).
 20. 湯元良子, 肺胞上皮細胞の分化転換に伴うペプチドトランスポーターの発現・機能変化と喫煙関連物質の影響, 医療薬学フォーラム2014/第22回CPS, 2014年6月28～29日, ビッグサイトTFTホール (東京都)
 21. 高野幹久, 肺胞上皮細胞の分化転換と薬物輸送機能, 日本薬剤学会第29年会, 2014年5月20～22日, 大宮ソニックシティビル (埼玉県・さいたま市) (招待講演)
 22. 川見昌史, 肺障害性薬物によるヒト由来培養肺胞上皮細胞 A549 の上皮間葉転換の解析, 日本薬剤学会第29年会, 2014年5月20～22日, 大宮ソニックシティビル (埼玉県・さいたま市)
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
高野 幹久 (TAKANO, Mikihiisa)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究科・教授
研究者番号: 20211336
 - (2) 研究分担者
なし ()
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科・准教授
研究者番号: 70379915

川見 昌史 (KAWAMI, Masashi)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究科・助教
研究者番号: 20725775
 - (4) 研究協力者
Carsten Ehrhardt

Kwang-Jin Kim