

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670078

研究課題名(和文)薬物の肺挙動・肺毒性研究のための肺胞上皮型細胞モデルの開発

研究課題名(英文)Development of a novel model of alveolar type I cells for the study on drug transport and toxicity in the lung

研究代表者

高野 幹久 (TAKANO, MIKIHISA)

広島大学・医歯薬保健学研究院(薬)・教授

研究者番号：20211336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト肺胞上皮型細胞モデルとして汎用されているA549細胞から、限界希釈法によって複数のクローン細胞を得た。得られたクローンの中から、型細胞に特異的に発現している異物排出ポンプ P-glycoprotein (P-gp)の発現・機能の高いA549/P-gp細胞を得ることができた。A549/P-gp細胞では親細胞に比べてP-gpのみならず型マーカー遺伝子の発現も上昇しており、型細胞の形質を有するものと考えられた。A549/P-gp細胞を用いて、P-gp機能に及ぼすタバコ煙抽出物(CSE)の影響を解析し、CSEは肺胞上皮細胞のP-gp機能を阻害することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The distal air spaces of the lungs are lined with a continuous epithelium comprising two types of alveolar epithelial cells, type I and type II. At present, no good cell line having type I cell-like phenotype is available. In alveolar epithelial cells, P-glycoprotein (P-gp) is selectively expressed in type I cells but not in type II cells. Using a limited dilution method, we successfully isolated an A549 clone (A549/P-gp) highly expressing P-gp as well as type I cell marker mRNAs, while P-gp expression in native A549 cells was negligible. Using A549/P-gp cells, the effect of cigarette smoke extract (CSE) on P-gp function in the lung alveoli was examined, and we found that CSE had inhibitory effect on P-gp function. A549/P-gp cells would be useful as a novel model of alveolar type I cells.

研究分野：生物薬剤学

キーワード：薬学 肺胞上皮細胞 型細胞 モデル細胞開発 分化転換

### 1. 研究開始当初の背景

経肺投与は、注射に代わる投与経路として注目され、タンパク質性・ペプチド性医薬を含め、様々な経肺投与製剤の開発が世界中で活発に進められている。肺胞は呼吸を担う重要な組織であり、その腔内は肺胞上皮型細胞およびⅠ型細胞で覆われている。肺胞の表面積の90~95%を占めるのはⅠ型上皮細胞である。一方、Ⅱ型細胞はⅠ型細胞間に点在し、占める面積は5~10%に過ぎない。従って、肺胞腔内からの薬物吸収や呼吸機能に対する薬物・生体異物の影響(特に毒性)を考える上では、Ⅰ型細胞が主たるターゲットとなる。これまで、ヒト由来の株化培養肺胞上皮細胞として、A549細胞やH441細胞が汎用されてきた。これら細胞はⅠ型細胞の特性を保持しているとされる。一方、肺胞上皮Ⅱ型細胞の特性を有するヒト由来株化培養細胞は存在しない。また、初代培養細胞系を用いればⅡ型(様)細胞の研究は可能ではあるが、培養日数とともにⅡ型の形質も変化していくため、薬物の毒性研究など長期処理を伴う研究は行えない。

### 2. 研究の目的

本研究では、薬物の肺挙動・肺毒性研究の推進のため、新たな肺胞上皮Ⅱ型細胞モデルを開発することを目的に検討を行った。ヒト由来の肺胞上皮Ⅱ型細胞モデルの開発は、培養細胞の形質制御という基礎科学面のみならず、薬物の肺吸収や肺毒性の研究、ひいては経肺投与製剤の開発という応用面にも大きく貢献しうるものである。

### 3. 研究の方法

(1) Ⅱ型形質を示す細胞のクローニング: 株化培養細胞はヘテロな細胞の集団からなる可能性が高い。そこでA549細胞を限界希釈法によって播種し、コロニー形成後、クローニングシリンダーを用いてセルクローニングを行った。得られたクローンから、Ⅱ型細胞で発現が高いmRNAの発現を指標に、よりⅡ型細胞に近い形質を示すクローンを選別した。mRNAの発現解析は、Real-time PCR法により行った。さらに、肺胞上皮においてⅡ型細胞においてのみ発現・機能している異物排出ポンプP-glycoprotein(P-gp)に焦点を当て、P-gpのmRNA発現レベルからクローン細胞の絞り込みを行った。P-gpタンパク質の発現レベルは、Western Blot法により行った。

(2) P-gp機能の評価: P-gp基質であるローダミン123(Rho123)の細胞内取り込み(蓄積)およびそれに及ぼすP-gp阻害剤の影響から、P-gp機能を評価した。

(3) P-gp機能に及ぼすタバコ煙抽出物(CSE)の影響解析: 市販のタバコ(MEVIUS)からCSEを喫煙用フィルターで捕捉・抽出し

た。P-gp機能を持つクローン細胞(A549/P-gp細胞)を用い、P-gp機能に及ぼすCSEの影響を解析した。

(4) 肺胞上皮細胞のⅡ型化を推し進める因子の探索: Ⅰ型細胞からⅡ型細胞への分化転換を促進するとの報告があるtransforming growth factor- $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1)およびinsulin-like growth factor-I(IGF-I)の影響について検討した。またヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるphenylbutyrate(PBA)の影響についても検討した。

### 4. 研究成果

(1) ヒト由来株化培養肺胞上皮細胞A549のクローニング: 20種類のクローンを作製し、Ⅱ型細胞マーカー遺伝子としてcaveolin-1、Ⅰ型細胞マーカー遺伝子としてATP-binding cassette A3(ABCA3)のmRNA発現を指標に、得られたクローンのスクリーニングを行った。その結果、親細胞であるA549細胞と比較してcaveolin-1の発現が高く、ABCA3の発現が低い、すなわちⅠ型細胞に近い形質を持つと考えられる5つのクローン(No. 3, 5, 16, 17, 20)が得られた。これらについてさらに、Ⅰ型細胞マーカーであるbreast cancer resistance protein(BCRP)およびP-gp、Ⅱ型細胞マーカーであるsurfactant protein C(SP-C)およびpeptide transporter 2(PEPT2)の発現を解析した。その結果、クローンNo. 20では、親細胞であるA549細胞と比較してⅡ型細胞マーカー(SP-C、PEPT2)のmRNA発現には有意な差は認められなかったが、Ⅰ型細胞マーカー(BCRP、P-gp)のmRNA発現が亢進していることが認められた(図1)。特に、P-gpのmRNA発現は他のクローンに比べても著しく高い値を示した。クローンNo. 20では、P-gpタンパク質発現でも有意な上昇が観察された。

(2) クローンNo. 20におけるP-gp機能の解析: P-gp基質としてRho123、P-gp阻害剤としてベラパミル(VRP)を用い、親細胞であるA549とクローンNo. 20でP-gp活性を

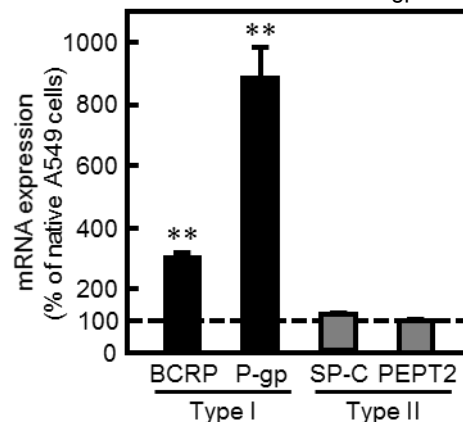


図1. クローンNo.20におけるⅠ型およびⅡ型マーカー mRNA の発現

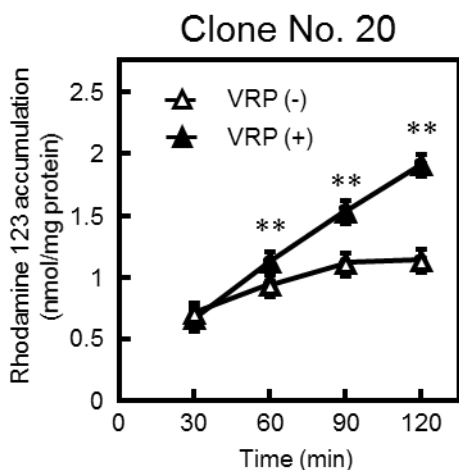
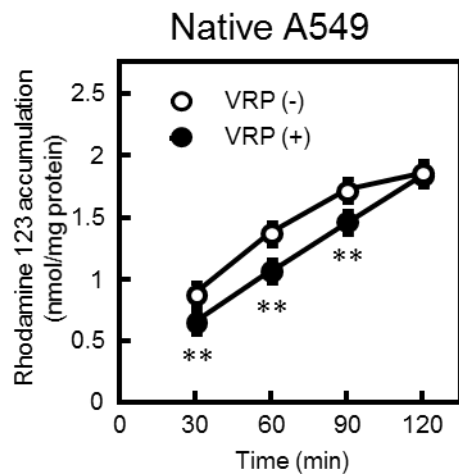


図2. A549細胞およびクローンNo.20におけるRho123の取り込みとVRPの影響

比較検討した。その結果、クローン No. 20ではVRPによるRho123の細胞内蓄積上昇が認められたが、A549細胞では明確なVRPの効果は認められなかった(図2)。従って、A549細胞ではP-gpは機能していないが、クローンNo. 20ではP-gpが働いていることが明らかとなった。以下、クローンNo. 20をA549/P-gp細胞と称する。

(3) 肺胞上皮細胞のP-gp機能に及ぼすCSEの影響：肺はタバコの煙に直接暴露される器官であり、肺における生体防御を担っている異物排出ポンプP-gpに対する喫煙の影響を明らかにすることは極めて重要である。そこでラット初代培養肺胞上皮細胞、および本研究で樹立したA549/P-gp細胞を用い、P-gp機能に及ぼすCSEの影響について検討した。ラット肺から調製した初代培養型細胞は培養日数とともにI型様細胞に分化転換し、それに伴ってP-gpのmRNA発現、タンパク質発現および輸送活性が有意に上昇した。すなわち、P-gpは型様細胞においてのみ発現・機能していた。そこでまず、P-gp機能に及ぼすCSEの影響についてI型様細胞を用いて解析した結果、CSE共存によって細胞内Rho123蓄積量は増加し、P-gp活性の有意な低下を認められた。一方、初代培養細胞は型細胞を単離後、

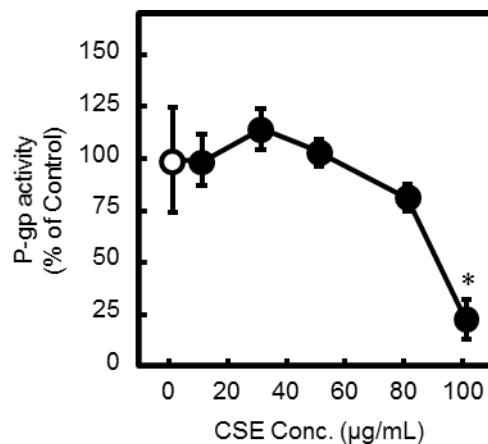


図3. A549/P-gp細胞におけるP-gp活性に及ぼすCSEの影響

播種すると最初は型形質を示すが、時間の経過に伴ってI型様細胞に分化転換する。さらに、長時間培養すると型様細胞に交じって線維芽細胞様の細胞が増えてくる。すなわち、型形質も長期間は保持されない。従って、長期間の処置を伴うような実験には適していない。そこで次に、A549/P-gp細胞を用い、同様にP-gp機能に及ぼすCSEの影響を解析した。その結果、A549/P-gp細胞においても初代培養型様細胞と同様に、CSEの濃度依存的にP-gp活性は低下することが明らかとなった(図3)。従って、A549/P-gp細胞は肺胞上皮型細胞の機能、特にP-gp機能に対する異物の影響やその制御機構の解明に有用なモデル細胞と考えられた。

(4) A549/P-gp細胞の形質に及ぼす各種因子の影響解析：A549/P-gp細胞の形質をさらに型細胞に近づけるため、各種化合物の影響について解析した。まず、型細胞から型細胞への分化転換を促進するとの報告があるTGF- $\beta$ 1およびIGF-1の影響について検討した。TGF- $\beta$ 1はTGF- $\beta$ スーパーファミリーに属するサイトカインで、幅広い生理活性を有する。我々は既に肺胞上皮細胞をTGF- $\beta$ 1で処置することによって、上皮間葉転換(EMT)が引き起こされることを明らかにしている。そこで本研究では、EMT誘発実験に用いた濃度(10 ng/mL)よりも低い濃度のTGF- $\beta$ 1を用いて検討を行った。しかし、TGF- $\beta$ 1濃度を0.1 ng/mLまで下げてもEMTが引き起こされる可能性が示唆され、またこの濃度では型形質の亢進効果は明確には観察されなかった。次に、IGF-1の影響について検討した。肺においてIGF-1は、主に肺胞上皮細胞や肺胞マクロファージにより産生され、上皮細胞の分化に関与することが報告されている。しかし、A549/P-gp細胞を種々の濃度のIGF-1で処置しても、細胞形態や型マーカー遺伝子の発現変化は見られなかった。従って、A549/P-gp細胞では、TGF- $\beta$ 1やIGF-1処置による型形質の亢進は起こらないものと考えられた。そこでさらに、PBAの影響

について検討した。我々の研究室では、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤である PBA を別の研究目的で用いていたが、偶然、細胞が扁平化することを他の細胞で認めた。Ⅱ型細胞は立方上皮のⅡ型細胞と異なり、厚さの極めて薄い扁平上皮であり、その薄さが速やかなガス交換に役立っている。そこで、A549/P-gp 細胞を PBA で処置したところ、Ⅱ型細胞と類似した扁平状の形態に変化した。さらに caveolin-1 や RAGE など、一部のⅡ型細胞マーカーの mRNA 発現が上昇した。しかしある種のⅡ型細胞マーカーの上昇も観察されたため、Ⅱ型形質の全般的な亢進には至らなかった。

以上の結果を以下にまとめる。

- A549 細胞のセルクローニングにより、Ⅱ型形質、特に肺泡でⅡ型細胞選択的に発現・機能している P-gp が高発現している A549/P-gp 細胞を得ることができた。
- A549/P-gp 細胞では、親細胞である A549 細胞では機能していない P-gp の活性が認められた。
- A549/P-gp 細胞を利用することで、ヒト肺泡上皮細胞における P-gp 機能に対する CSE の阻害効果を明らかにすることができた。従って、A549/P-gp 細胞は、肺泡上皮Ⅱ型細胞の機能、特に P-gp 機能に対する異物の影響やその制御機構の解明に有用なモデル細胞と考えられた。
- TGF- $\beta$ 1 や IGF-1 では A549/P-gp 細胞のⅡ型形質の亢進は認められなかったが、PBA によりⅡ型細胞と類似した扁平状の細胞形態への変化や一部のⅡ型細胞マーカーの mRNA 発現上昇が認められた。PBA の処置条件をさらに検討することで、さらにⅡ型細胞に近いモデル細胞が得られる可能性が示唆された。

## 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 10 件)すべて査読有

1. Kawami, M., Harabayashi, R., Miyamoto, M., Harada, R., Yumoto, R. and Takano, M.: Methotrexate-induced epithelial-mesenchymal transition in the alveolar epithelial cell line A549, *Lung*, 194, 923-930 (2016) (DOI: 10.1007/s00408-016-9935-7).
2. Takano, M., Naka, R., Sasaki Y., Nishimoto S. and Yumoto, R.: Effect of cigarette smoke extract on P-glycoprotein function in primary cultured and newly developed alveolar epithelial cells, *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 31, 417-424 (2016) (DOI: 10.1016/j.dmpk.2016.08.006).
3. Takano, M., Nagahiro, M. and Yumoto, R.: Transport mechanism of nicotine in primary cultured alveolar epithelial cells, *J. Pharm.*

*Sci.*, 105, 982-988 (2016)

(DOI 10.1002/jps.24627)

4. Takano, M., Sugimoto, N., Ehrhardt, C. and Yumoto, R.: Functional expression of PEPT2 in the human distal lung epithelial cell line NCI-H441, *Pharm. Res.*, 32 (12), 3916-3926 (2015) (DOI: 10.1007/s11095-015-1751-x)
5. Yumoto, R., Hirabayashi, Y., Imaoka, H., Toyota, S. and Takano, M.: Development of a novel stop solution for membrane transport study, *Membrane*, 40 (5), 296-303 (2015) (DOI:なし)
6. Kawami, M., Miyamoto, M., Yumoto, R. and Takano, M.: Methotrexate influx via folate transporters into alveolar epithelial cell line A549, *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 30, 276-281 (2015) (DOI: 10.1016/j.dmpk.2015.04.005.)
7. Takano, M., Yamamoto, C., Yamaguchi, K., Kawami, M. and Yumoto, R.: Analysis of TGF- $\beta$ 1- and drug-induced epithelial-mesenchymal transition in cultured alveolar epithelial cell line RLE/Abca3, *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 30 (1), 111-118 (2015) (DOI: org/10.1016/j.dmpk.2014.10.007)
8. Takano, M., Kakizoe, S., Kawami, M., Nagai, J., Patanasethanont, D., Sripanidkulchai, B. and Yumoto, R.: Modulation of P-glycoprotein function and multidrug resistance in cancer cells by Thai plant extracts, *Pharmazie*, 69: 823-828 (2014) (DOI: 10.1691/ph.2014.4619)
9. Nagai, J., Yamamoto, A., Katagiri, Y., Yumoto, R. and Takano, M.: Fatty acid-bearing albumin but not fatty acid-depleted albumin induces HIF-1 activation in human renal proximal tubular epithelial cell line HK-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 450 (1), 476-81 (2014) (DOI: org/10.1016/j.bbrc.2014.05.146)
10. Nagai, J. and Takano, M.: Entry of aminoglycosides into renal tubular epithelial cells via endocytosis-dependent and -independent pathways. *Biochem. Pharmacol.*, 90, 331-337 (2014) Review (DOI: 10.1016/j.bcp.2014.05.018)

[学会発表](計 24 件)

1. 出口純也、培養肺泡上皮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、2017/3/25-27、仙台国際センター/東北大学川内地区(宮城県仙台市)
2. 仲 亮輔、肺泡上皮細胞における異物排出ポンプ P-glycoprotein の発現と機能に及ぼすタバコ煙抽出物の影響、膜シンポジウム 2016、2016/12/1-2、関西大学(大阪府吹田市)

3. 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、2016/11/5-6、就実大学(岡山県岡山市)
4. Ryosuke Naka, Effect of cigarette smoke extract on P-glycoprotein function in alveolar epithelial cells, 31st JSSX Annual Meeting in Matsumoto, 2016/10/13-15、キッセイ文化ホール/松本市総合体育館(長野県松本市)
5. Mikihisa Takano, Functional expression of PEPT2 and its regulation in alveolar epithelial cells、Workshop on Drug Transporters in the Lungs, 2016/9-22-23、Trinity College Dublin, Dublin (Ireland)
6. 仲 亮輔、初代培養肺胞上皮細胞およびクローン化 A549 細胞における P-glycoprotein の発現・機能とタバコ煙抽出物の影響、日本膜学会第 38 年会、2016/5/10-11、早稲田大学(東京都)
7. 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、2016/3/27-29、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
8. 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・機能解析、膜シンポジウム 2015、2015/11/25-26、神戸大学百年記念館(兵庫県神戸市)
9. 西本沙央里、肺胞上皮における異物排出ポンプ P-gp の発現・機能とその解析のための新たな培養細胞系の開発、第 25 回日本医療薬学会年会、2015/11/21-23、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
10. Chinami Nekomoto, Role of miRNAs in TGF- $\beta$ 1- and drug-induced epithelial mesenchymal transition in alveolar type II epithelial cells, 30th JSSX Annual Meeting, 2015/11/12-15、タワーホール船堀(東京都)
11. 岸本海、肺胞上皮における薬物輸送・毒性解析のための II 型細胞形質維持法の開発、第 54 回日本薬学会中国四国支部学術大会、2015/10/31-11/1、高知市文化プラザかるぼーと(高知県高知市)
12. Ryoko Yumoto, Transport mechanism of nicotine in alveolar type I and type II epithelial cells, 20th NORTH AMERICAN REGIONAL ISSX MEETING, 2015/10/18-22, the Hilton Orlando Bonnet Creek, Florida (USA)
13. 宮本未緒花、肺胞上皮細胞におけるメトトレキサートの輸送機構の解明、医療薬学フォーラム 2015/第 23 回クリニカルファーマシーシンポジウム、2015/7/4-5、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)
14. 川見昌史、肺胞上皮細胞における葉酸トランスポーターを介したメトトレキサートの輸送、第 10 回トランスポーター研究会、2015/6/20-21、慶應義塾大学薬学部(東京都)
15. 猫本千波、TGF- $\beta$ 1 および肺障害性薬物による肺胞上皮 II 型細胞の上皮間葉転換と miRNA 発現との関連解析、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、2015/5/20-23、長崎ブリックホール(長崎県長崎市)
16. 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、2015/3/26-28、神戸学院大学(兵庫県神戸市)
17. 佐々木佳宏、喫煙による肺胞上皮 II 型細胞のペプチドトランスポーター Pept2 の機能変動、2014、2014/11/26-27、膜シンポジウム、神戸大学百年記念館(兵庫県神戸市)
18. Kawami, M., Evaluation of epithelial-mesenchymal transition associated with methotrexate-induced injury in cultured human alveolar epithelial cell line, The 8th Young Investigators Symposium on Clinical Pharmaceutical Sciences, 2014/11/15-16、熊本大学薬学部(熊本県熊本市)
19. 山口晃輝、培養肺胞上皮細胞 RLE/Abca3 を用いた薬剤誘発性上皮間葉転換の解析、第 53 回日本薬学会中国四国支部学術大会、2014/11/8-9、広島国際会議場(広島県広島市)
20. Ryoko Yumoto, Effect of cigarette smoke extract on PEPT2 function in alveolar epithelial cells, JSSX-ISSX Joint Meeting in San Francisco, 2014/10/18-23, the Hilton San Francisco Union Square Hotel, San Francisco (USA)
21. 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 回クリニカルファーマシーシンポジウム、2014/6/28-29、ビッグサイト TFT ホール(東京都)
22. 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、2014/5/20-22、大宮ソニックシティビル(埼玉県さいたま市)
23. 佐々木佳寛、肺胞上皮細胞における Peptide Transporter 2 の発現・機能と喫煙関連物質の影響、日本膜学会第 36 年会、2014-5-12-13、早稲田大学(東京都)
24. Ryoko Yumoto, Expression and function of a peptide transporter PEPT2 in alveolar epithelial cells in culture, The 5th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress 2014, 2014/4/13-16, Melbourne Convention and Exhibition Centre Melbourne、Melbourne (Australia)

6. 研究組織  
(1)研究代表者

高野 幹久 (TAKANO MIKIHISA)  
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授  
研究者番号：20211336

(2)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院・准教授  
研究者番号：70379915