慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	胎児胎盤系の胆汁酸動態における経胎盤排泄分子機構と破綻時における胎児毒性
Sub Title	Molecular mechanism of regulation of bile acids in fetoplacental unit and fetal toxicities by malfunction of the placenta
Author	西村, 友宏(Nishimura, Tomohiro)
Publisher	
Publication year	2012
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2011.)
JaLC DOI	
Abstract	本研究では胆汁中の成分である胆汁酸の組織透過性および血中濃度調節に関与するタンパク質である胆汁酸トランスポーターのうち胎盤に比較的特異的に発現するSlc10a3のラット胎盤内局所発現分布および胆汁酸輸送特性を一部解明した。胎児が正常に成長するためには胆汁中の成分である胆汁酸が胎児の血液中において適切な濃度に維持されることが重要であり、これらの成果は胎盤の機能不全と胎児成長との関係の解明に有益な情報となる。
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2010～2011 課題番号：22790171 研究分野：医歯薬学 科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_22790171seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様式Ｃ－１９

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成２４年５月１５日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2010～2011
課題番号：２２７９０１７１

研究課題名（和文）
胎児胎盤系の胆汁酸動態における経胎盤排泄分子機構と破綻時における胎児毒性

研究課題名（英文）
Molecular mechanism of regulation of bile acids in fetoplacental unit and fetal toxicities by malfunction of the placenta

研究代表者
西村　友宏（NISHIMURA TOMOHIRO）
慶應義塾大学・薬学部・助教
研究者番号：40453518

研究成果の概要（和文）：
本研究では胆汁中の成分である胆汁酸の組織透過性および血中濃度調節に関与するタンパク質である胆汁酸トランスポーターのうち胎盤に比較的特異的に発現する Slc10a3 のラット胎盤内局所発現分布および胆汁酸輸送特性を一部解明した。胎児が正常に成長するためには胆汁中の成分である胆汁酸が胎児の血液中において適切な濃度に維持されることが重要であり、これらの成果は胎盤の機能不全と胎児成長との関係の解明に有益な情報となる。

研究成果の概要（英文）：
This study has partly clarified that rat placental localization and the molecular function of a bile acid transporter, Slc10a3 which is a possible molecule regulating tissue and plasma concentration of bile acids and is expressed particularly in the placenta. It is essential that plasma concentration of bile acids is strictly controlled in the fetus for the normal fetal growth. The findings in the present study will be relevant to the relationship between malfunction of the placenta and deficiency of fetal growth.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
２０１０年度	1,900,000	570,000	2,470,000
２０１１年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総　計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学
キーワード：胎児胎盤系、血液胎盤関門、胆汁酸、トランスポーター、胎児毒性、胆汁鬱滞

１．研究開始当初の背景

胎児胎盤系において胆汁酸は母体血へと移行するが、母体血清胆汁酸が異常上昇する妊娠性肝内胆汁うっ滞症（Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy，以下、ICP と略）において、早産、胎児仮死、周産期死亡が頻発する。しかしながら ICP における胎児毒性発症の機序は不明であり、胎児胎盤系の胆汁酸動態と破綻の影響の解明が必要である。本研究の目的は胎児胎盤系における胆汁酸の

生理的動態の分子機構を解明し、ICP における血清高胆汁酸血症が胎児胎盤系の胆汁酸動態に及ぼす影響を明らかにすることにより、胎児毒性回避への治療戦略の基盤を提案することである。

２．研究の目的

遺伝子発現、タンパク局在、胆汁酸の細胞膜透過性を検討する。必要に応じ、比較対象となるタンパク質および薬物、栄養物輸送の評価を同時に行い、胎児胎盤系の胆汁酸動態の知見を得る。

(1) ラット胎盤および合胞性栄養膜細胞(TR-TBT)における胆汁酸トランスポーターの発現を検討し、モデル細胞としての妥当性を評価する。

(2)胆汁酸トランスポーターの胎盤発現における妊娠時期特異性解析により遺伝子発現の恒常性を評価する。

(3)Slc10a3 の細胞内局在発現を決定する。

(4)Slc10a3 のラット胎盤におけるタンパク局在発現を解明する。

(5)胆汁酸の経胎盤輸送における方向性を合胞性栄養膜細胞を用いて明らかにする。

(6)Slc10a3 遺伝子発現細胞を作成し、Slc10a3 の胆汁酸輸送活性を評価する。

(7)ラット胎盤での胆汁酸取り込み能を評価する。

３．研究の方法

(1) ラット胎盤および TR-TBT 細胞において Slc10 ファミリーの遺伝子発現を定量的 RT-PCR にて測定する。

(2)ラット胎盤より妊娠時期特異的に RT-PCR 解析を行う。

(3)N 末端で GFP と融合した Slc10a3 を発現する遺伝子発現ベクターを作製し(GFP-Slc10a3)、HEK293 細胞および TR-TBT 細胞に遺伝子導入し、蛍光顕微鏡により評価する。

(4) ラット胎盤の免疫組織化学法により Slc10a3 の局在を評価する。抗体は市販品を用い抗体のラット Slc10a3 に対する特異性は遺伝子強制発現系を用いて検討する。

(5) 血液-胎盤関門モデル合胞性栄養膜細 TR-TBT 細胞を用い、経細胞輸送により胎児-母体間の胆汁酸輸送の方向性を明らかにする。

(6) Slc10a3 の胆汁酸輸送活性を *Xenopus* oocyte を用いた遺伝子発現系にて評価する。

(7) 胆汁酸のラット胎盤における取り込み輸送を放射標識化合物を用いて検討する。

４．研究成果

(1) ラット胎盤における胆汁酸トランスポーターの発現を定量的 RT-PCR により測定したところ、Slc10a3，10a4，10a5，10a7 が発現し、一方で Slc10a ファミリーに属する他の胆汁酸トランスポーターの発現は少ないことが示された。血液-胎盤関門モデル合胞性栄養膜細胞 TR-TBT 細胞を用い、同様に Slc10a ファミリーの発現を検討したところ胎盤と同様の発現プロファイルを示した。特に Slc10a3 の発現は多く、これはヒトでの知見と対応しており、ラット胎盤はヒトでの胆汁酸動態モデルとして適当であると考えられた。

(2) 胆汁酸トランスポーター発現の妊娠時期特異性を定量的 RT-PCR 法により調べたところ。Slc10a3 および Slc10a7 の胎盤発現は妊娠時期依存性は少ないことが示され、妊娠時期を通した胎児胎盤系の胆汁酸動態に関与する可能性が示唆された。

(3) Slc10a3 の胎盤細胞における細胞内局在を解明するため、GFP-Slc10a3 を作製した。HEK293 細胞および TR-TBT 細胞に遺伝子導入し、蛍光顕微鏡により観察した。Slc10a3 は主に細胞内に局在し、一部は細胞膜にも存在することが示唆された。

(4)GFP-Slc10a3 遺伝子強制細胞において GFP および抗 Slc10a3 抗体の共局在性により抗体の特異性を確認した。さらに Slc10a3 に関して胎盤でのタンパク発現を免疫染色法により検討した。Slc10a3 は血液胎盤関門において、合胞体性栄養膜層に発現する P 糖タンパクと類似する細胞層に発現することが示された。このことから、Slc10a3 は血液胎盤関門の実態として重要な合胞体性栄養膜層に発現することが示された。

(5) 胎盤における胆汁酸の動態を明らかにするため、TR-TBT 細胞における経細胞輸送により胎児-母体間の胆汁酸輸送の方向性を検討した。薬物には胎児血に多く含まれる[^{3}H]taurocholic acid を用い、胎児血側薬液から母体血側溶液へ放射標識体薬物輸送、お

よび逆方向の輸送実験を行ったが、Slc10 ファミリーの特徴とされる Na^+依存性は観察されなかった。

(6) Slc10a3 の胆汁酸輸送活性を *Xenopus* oocyte を用いた遺伝子発現系にて検討したが、抱合型一次胆汁酸([^{3}H]taurocholic acid) および二次胆汁酸([^{3}H]lithocholic acid) の輸送活性を示さなかった。以上より、Slc10a3 はラット胎盤においても発現するが、基質認識性が狭く胆汁酸の中でも一部の胆汁酸の生理動態に関与するのではないかと考えられた。

(7) [^{3}H]taurocholic acidおよび[^{3}H]lithocholic acidのラット胎盤取り込み輸送能を解析した。しかしながら、これらの胆汁酸における胎盤輸送にSlc10aファミリーが関与するとの知見は未だ得られていない。

結論として、一部の能動輸送型胆汁酸トランスポーターファミリーの血液胎盤関門での発現がタンパクレベルで明らかになった。一方で、多数の抱合代謝物が存在する総胆汁酸において、基質選択性の観点からさらなる検討が必要ある。

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　5　件）

① Nishimura T, Chishu T, Tomi M, Nakamura R, Sato K, Kose N, Sai Y, Nakashima E. Mechanism of nucleoside uptake in rat placenta and induction of placental CNT2 in experimental diabetes. Drug Metab Pharmacokinet. 2012
査読有
doi:10.2133/dmpk.DMPK-11-RG-103

② Tomi M, Nishimura T, Nakashima E. Mother-to-fetus transfer of antiviral drugs and the involvement of transporters at the placental barrier. J Pharm Sci. 2011 Sep;100(9):3708-18.
査読有
doi: 10.1002/jps.22642

③ Nishimura T, Tanaka J, Tomi M, Seki Y, Kose N, Sai Y, Nakashima E. Enhancement of zidovudine transfer to molt-4 cells, a human t-cell model, by dehydroepiandrosterone sulfate. J Pharm Sci. 2011 Sep;100(9):3959-67.
査読有
doi:10.1002/jps.22624

④ Nishimura T, Sai Y, Fujii J, Muta M, Iizasa H, Tomi M, Deureh M, Kose N, Nakashima E. Roles of TauT and system A in cytoprotection of rat syncytiotrophoblast cell line exposed to hypertonic stress. Placenta. 2010 Nov;31(11):1003-9.
査読有
doi:10.1016/j.placenta.2010.08.003

⑤ Higuchi K, Iizasa H, Sai Y, Horieya S, Lee KE, Wada M, Deguchi M, Nishimura T, Wakayama T, Tamura A, Tsukita S, Kose N, Kang YS, Nakashima E. Differential expression of ezrin and CLP36 in the two layers of syncytiotrophoblast in rats. Biol Pharm Bull. 2010;33(8):1400-6.
査読有
doi:10.1248/bpb.33.1400

〔学会発表〕（計　3　件）

①西村友宏、堀越美穂、登美斉俊、巨勢典子、中島恵美. HMG-CoA 還元酵素阻害薬の *in vivo* ラット胎盤透過性の比較.
日本薬剤学会第 25 年会、2010.5.12-14、徳島

②Nishimura T, Tomi M, Sai Y, Nakashima E. Improved transfer zidovudine by dehydroepiandrosterone sulfate in CD4(+) T lymphocyte, Molt-4 cells.
ISSX 9th International Meeting, 2010.9.4-8, Istanbul, Turkey

③山崎万郁、西村友宏、樋口慧、登美斉俊、中島恵美. 胎盤発現トランスポーター Slc10a3 の組織・細胞内局在解析.
日本薬学会第 132 年会、2012/03/28-31、札幌

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計　0　件）

名称：

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

６．研究組織
(1)研究代表者
西村　友宏（NISHIMURA TOMOHIRO）
慶應義塾大学・薬学部・助教
研究者番号：40453518

(2)研究分担者
該当しません
（　　）

研究者番号：

(3)連携研究者
該当しません
（　　）

研究者番号：