

報告番号	甲 乙 第 号	氏 名	高木 彰紀
<p>主 論 文 題 名 :</p> <p>胎盤関門における equilibrative nucleoside transporter を介した薬物輸送</p>			
<p>(内容の要旨)</p> <p><b>【背景】</b></p> <p>胎盤関門は syncytiotrophoblast による上皮細胞層で形成され、細胞同士が融合した多核細胞となることで細胞間隙を介した物質透過を著しく制限し、母体血と胎児血を隔てている。そのため、栄養物や薬物などの異物が胎児に移行するには、syncytiotrophoblast で形成される細胞層を透過する必要がある。Syncytiotrophoblast の母体側および胎児側の細胞膜には、それぞれ輸送体を含む種々の膜タンパク質が極性をもって局在しており、胎盤関門を介した物質の透過を制御している。胎盤関門は薬物の胎児中濃度を規定することで、胎児における薬効や安全性に影響する重要な因子である。</p> <p>妊婦における薬物治療の潜在的需要は大きい。現状では薬物治療は抑制されている。これは、胎盤関門を介した薬物の胎児移行性評価を含め、ヒト胎児における薬物の安全性に関連する情報が不足していることに起因する。薬物の胎盤透過を規定する輸送体を明らかにすることは、胎児における薬物の安全性評価の精度を高めるために必要である。本研究では、DNA・RNA 合成を阻害する薬物としてピリミジン塩基誘導体である fluorouracil とグアノシン誘導体である ribavirin に着目した。</p> <p>Fluorouracil と ribavirin は共に水溶性が高く、受動拡散によって細胞膜を透過することは困難であるため、輸送体を介して胎盤関門を透過している可能性が高い。Fluorouracil および ribavirin を基質として認識する輸送体にヌクレオシド輸送体がある。ヌクレオシド輸送体は、sodium-dependent concentrative nucleoside transporter (CNT1-3; SLC28A1-3) と equilibrative nucleoside transporter (ENT1-4; SLC29A1-4) の 2 つのファミリーに大別される。CNT は、Na<sup>+</sup> 依存性かつ濃縮的にヌクレオシドを輸送するが、ヒトとラット胎盤関門において Na<sup>+</sup> 依存性 uridine 取り込み活性が示されないため、胎盤関門においてはほとんど機能していないと考えられている。</p> <p>ENT1 は、特異的阻害剤である nitrobenzyl thioinosine (NBMPR) によって高感受性に阻害される輸送体として同定されている。ENT2 は、ENT1 と同様ヌクレオシドを認識し、さらに核酸塩基も認識する。ヒト胎盤関門において、ENT1 は syncytiotrophoblast の微絨毛膜に発現していることが免疫染色によって明らかになっている。一方、ENT2 は syncytiotrophoblast の細胞膜に発現しているかは明確ではない。加えて、ヒト胎盤微絨毛膜ベシクルにおいて adenosine 取り込みが 10 μM NBMPR によって 70% 減少し、また NBMPR 結合における K<sub>d</sub> 値が 0.7 nM であることから、母体側から syncytiotrophoblast へのヌクレオシド輸送に ENT1 の関与が示唆されている。一方で、ENT2 の寄与は明確にされていない。ラット胎盤微絨毛膜ベシクルにおける adenosine 取り込みは、0.1 μM NBMPR で 28%、100 μM NBMPR でさらに 23% 減少することから、ラット胎盤関門においては、ENT1 と ENT2 が機能していると報告されている。</p> <p>Fluorouracil は、これまでにヒト ENT1、ヒト ENT2 の基質であることがアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた検討により示されている。基質認識の観点では、ヒト ENT1、ヒト ENT2 の両者が fluorouracil を輸送するが、胎盤関門を介した fluorouracil 輸送に ENT1 および ENT2 が関与するかは明らかにされていない。</p> <p>Ribavirin を基質として認識する担体として ENT1、ENT2、CNT3 が報告されている。胎盤関門で機能していると考えられる ENT のうち、ENT1 に関しては複数の報告で ribavirin を基質として認識することが報告されている。一方で、ENT2 に関しては、議論がわかれている。Ribavirin が ENT2 の基質であるとする報告では、アフリカツメガエル卵母細胞を用いたヒト ENT2 の発現系において、ribavirin の濃度依存的に取り込みが観察され、ヒト ENT2 の基質であることを示している。一方で、ENT2 過剰発現 HeLa 細胞を用いた検討では、ENT2 を介した ribavirin 輸送は見出されていない。我々のグループにおいても、アフリカツメガエル卵母細胞を用いてラット ENT2 発現</p>			

系による ribavirin 取り込みを検討したところ、ラット ENT2 発現による ribavirin の取り込み上昇は示されなかった。胎児移行機構に関しては、ヒト胎盤関門のモデル BeWo 細胞における ribavirin 取り込み輸送が検討されている。BeWo 細胞を介した ribavirin の輸送には、ENT1 または ENT2 の関与が示唆されている。ラットに関しては、我々のグループが ribavirin の胎児移行性を検討している。細胞間隙を透過する sucrose と比較して ribavirin の胎児移行率は高く、なんらかの担体が ribavirin の胎児移行を促進している可能性を示唆している。これまで、ribavirin はヒト・ラット胎盤関門において担体を介して透過することが明らかではあるものの ENT1 と ENT2 の役割は同定できていない。

### 【目的】

本研究では、fluorouracil と ribavirin の胎盤関門透過に関与する輸送体を明らかにすることを目的とした。本目的を達成するため、まず fluorouracil と ribavirin の胎児移行に関与する輸送体をラットにおいて解析した。その上でその胎盤関門細胞膜における輸送体タンパクの発現分子数をラットとヒト間で比較することで、明らかにした透過メカニズムがヒトでも適用可能か評価した。

### 【方法】

妊娠 19.5 日目ラット母体の腹部大動脈に $^3\text{H}$ fluorouracil を高透過マーカーである $^{14}\text{C}$ antipyrine と共に投与し、胎児への透過性および輸送の担体介在性を評価した。ラット trophoblast 細胞株 TR-TBT 18d-1、または transporter を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞を用いて、fluorouracil および ribavirin の取り込み輸送への ENT1 および ENT2 の関与を評価した。ヒトおよびラット胎盤微絨毛膜画分、TR-TBT 18d-1 細胞粗膜画分における、ENT1 および ENT2 タンパクの発現量を LC-MS/MS を用いて定量した。さらに、妊娠期別ラット胎盤における ENT mRNA 発現量を定量 PCR 法にて解析した。

なお、本研究は、本学薬学部研究倫理委員会(150421-2)および本学医学部倫理委員会(20110250)に研究計画書を提出し、その内容が承認されたものである。

### 【結果】

#### 1. ENT を介した fluorouracil 輸送特性解析

妊娠 19.5 日目ラットの腹部大動脈に $^3\text{H}$ fluorouracil を $^{14}\text{C}$ antipyrine と共に急速投与し、fluorouracil と antipyrine の胎児移行クリアランスの比である fetus uptake index 値を算出した。 $^3\text{H}$ Fluorouracil の fetus uptake index は 23%であり、同様に算出した細胞間隙透過マーカー $^{14}\text{C}$ sucrose の 7.3%と比較して有意に高いことが示された。さらに、20 mM の非標識 fluorouracil 共存下において、 $^3\text{H}$ fluorouracil の fetus uptake index は 14%にまで低下し、担体を介した fluorouracil の胎児移行が示唆された。

TR-TBT 18d-1 細胞による $^3\text{H}$ fluorouracil 取り込みは、ENT1 を選択的に阻害する 0.1  $\mu\text{M}$  NBMPR では、全く影響を受けなかった。一方、ENT1 に加えて ENT2 も阻害する 100  $\mu\text{M}$  NBMPR、10  $\mu\text{M}$  dipyridamole、および 5 mM uridine では取り込みが 50%以上阻害された。核酸塩基のうち、5 mM uracil および 5 mM adenine は $^3\text{H}$ fluorouracil 取り込みに影響を与えなかったものの、5 mM thymine では取り込みが阻害された。さらに organic anion transporter の代表的基質である 1 mM パラアミノ馬尿酸についても、 $^3\text{H}$ fluorouracil の取り込みに影響を与えなかった。アフリカツメガエル卵母細胞に対する $^3\text{H}$ fluorouracil 取り込み活性は ENT1 の発現によっては上昇せず、ENT2 の発現によってのみ有意に上昇した。これらの結果から、fluorouracil は ENT2 によって基質認識される一方、ENT1 による認識性は低いことが明らかとなった。

#### 2. ENT を介した ribavirin 輸送特性解析

TR-TBT 18d-1 細胞による $^3\text{H}$ ribavirin 取り込みに対する各種輸送体の阻害剤の影響を評価した結果、0.1  $\mu\text{M}$  NBMPR で 40%程度阻害され、ENT1 が ribavirin 輸送の少なくとも一部に関与することが示唆された。NBMPR の濃度を 100  $\mu\text{M}$  まで上昇させることで $^3\text{H}$ ribavirin 取り込みはほぼ完全に阻害された一方、10  $\mu\text{M}$  dipyridamole による阻害は 55%に留まり、ENT2 の関与は明確に示されなかった。1 mM パラアミノ馬尿酸による阻害効果はほとんど観察されず、5 mM uridine および 5 mM uracil では 70%程度阻害された。

### 3. 胎盤関門における ENT タンパク分子数解析

ヒトおよびラット胎盤関門細胞膜における ENT1 および ENT2 のタンパク発現分子数を明らかにするため、ヒト満期胎盤絨毛組織および妊娠 19.5 日ラット胎盤 labyrinth から微絨毛膜を精製した。さらに、TR-TBT 18d-1 細胞からも粗膜画分を精製した。これらサンプルにおける ENT1 および ENT2 タンパク発現分子数の定量を行った。胎盤微絨毛膜における ENT1 発現分子数はヒトで 11 fmol/ $\mu$ g protein であるのに対し、ラットで 2.0 fmol/ $\mu$ g protein であった。胎盤微絨毛膜における ENT2 タンパクは、ヒトで 0.57 fmol/ $\mu$ g protein、ラットで 0.67 fmol/ $\mu$ g protein であった。TR-TBT 18d-1 細胞の粗膜画分における ENT1 と ENT2 タンパクの発現分子数はそれぞれ 2.2 fmol/ $\mu$ g protein と 1.5 fmol/ $\mu$ g protein であった。ラット胎盤における妊娠時期別 ENT の mRNA 発現量を定量したところ、ENT1 の mRNA 量は、妊娠 13.5 日と比較し、妊娠 15.5 日において有意に発現量が高く、その後低下していった。一方、ENT2 に関しては妊娠時期を通じて発現量変動は認められなかった。

#### 【考察】

ラットにおける fluorouracil の胎盤透過性は paracellular marker である sucrose よりも高く、さらに fluorouracil の胎児移行性に飽和性が示され、胎盤関門の透過になんらかの担体が関与していることが示唆された。そこで TR-TBT 18d-1 細胞を用いて輸送特性の解析を行った。Fluorouracil の取り込みに対し、ヌクレオシドである uridine は核酸塩基である uracil、adenine、および thymine よりも強い阻害効果を示した。このことは、fluorouracil が核酸塩基誘導体であるにもかかわらず、sodium-dependent nucleobase transporter (SNBT1) に代表される核酸塩基を輸送する輸送体よりも、ヌクレオシドを輸送する輸送体が fluorouracil 輸送に関与していることを示唆している。さらに、ENT1 選択的阻害剤である 0.1  $\mu$ M NBMPR は fluorouracil 輸送に影響を与えなかったのに対し、ENT1 と ENT2 の両方を阻害する 100  $\mu$ M NBMPR と 10  $\mu$ M dipyridamole、5 mM uridine は fluorouracil 輸送を阻害した。本結果から、TR-TBT 18d-1 細胞における飽和性の fluorouracil 輸送には、ENT2 の関与が大きいことが示唆された。また TR-TBT 18d-1 細胞では、fluorouracil の取り込みに対し、OAT の典型的基質である 1 mM パラアミノ馬尿酸がほとんど影響を与えなかったことから、OAT2/3 の関与は低いと考えられる。ラット ENT1 による fluorouracil 輸送活性は、ラット ENT2 による輸送活性と比較し著しく小さいことを証明するため、ラット ENT1 とラット ENT2 をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、fluorouracil 取り込みを解析した。ネガティブコントロールと比較し、ENT2 の発現系のみが有意に高い fluorouracil 輸送活性を示し、ENT1 を介した輸送活性は検出されなかった。ラット ENT1 がヒト ENT1 と同様に fluorouracil を基質とする可能性は依然残されているものの、ヒトおよびラットいずれにおいても ENT1 を介した fluorouracil 輸送活性は ENT2 と比較して著しく低いといえる。そのため、fluorouracil の細胞膜透過を考える際には、ENT1 ではなく、ENT2 を考慮すべきである。

これまでに我々のグループは、ラット胎盤関門に発現する輸送体を介した ribavirin の胎児移行の可能性を示し、さらにラット ENT2 発現系において ribavirin 輸送活性は検出されず、ENT1 発現系のみで検出されることを明らかにしている。TR-TBT 18d-1 細胞における ribavirin 輸送を解析した結果、0.1  $\mu$ M NBMPR で ribavirin 輸送が有意に阻害され、ENT1 の関与が示唆された。一方、100  $\mu$ M NBMPR による阻害効果はより強く示されたものの、10  $\mu$ M dipyridamole による阻害はそこまで強く示されなかったことから、ENT2 が TR-TBT 18d-1 細胞における ribavirin 輸送に関与しているとは考えにくい。この結果は、発現系においてラット ENT1 のみが ribavirin 輸送を担っていることと相関している。

ENT タンパクの発現分子数定量結果から、ヒトおよびラット胎盤微絨毛膜において ENT1 および ENT2 が共に発現していることが明らかとなった。モデル細胞として用いた TR-TBT 18d-1 細胞でも ENT1 および ENT2 の発現が示され、相関が示された。ENT1 は、ラット胎盤関門と比較するとヒト胎盤関門で 5.5 倍多く発現していた。Ribavirin は、ラット胎盤関門においては ENT1 によって輸送されることを示唆したことから、ヒトにおける ribavirin の胎児移行速度は、ラットよりも大きい可能性がある。また、ラット ENT1 の胎盤における mRNA 発現量は妊娠日数によって変動しており、ribavirin の胎児移行速度に影響している可能性がある。さらに器官形成期である妊娠 14 日付近においてもラット ENT1 の mRNA が発現していたことは、胎盤における

ENT1 が妊娠 14 日付近でも機能していることを示唆し、*ribavirin* の催奇形性に関与する可能性を示している。ENT2 は、胎盤においてヒトとラットで同程度の発現量であることが明らかとなった。ENT2 に関しては、妊娠時期によって mRNA 発現量が変動せず、また胎盤関門における絶対発現量もヒトとラットで同程度であった。従って、ENT2 発現分子数で見ると、ヒトにおける *fluorouracil* の胎児移行速度は、ラットと同程度であることが推察される。また、このことは、ラット胎盤において ENT2 を介した輸送システムが器官形成期である妊娠 14 日付近でも機能していることを示唆しており、ENT2 が *fluorouracil* を胎児に移行させることを通じて、催奇形性に関与する可能性を提示している。

これまでに ENT は妊娠高血圧腎症やインスリン、低酸素状態、抗がん剤処理によって mRNA もしくはタンパクレベルで発現・機能変動を受けることが報告されている。病態時等における ENT 発現分子数の変動が、*fluorouracil* や *ribavirin* の胎児移行性に与える影響については、今後の課題としてさらに研究を深める必要がある。

#### 【結論】

本研究では、核酸塩基類縁薬物である *fluorouracil* と、ヌクレオシド系薬物である *ribavirin* の胎盤透過機構をラットで解明し、ヒトとの対応を発現分子数の面から評価した。*Fluorouracil* は、主に ENT2 を介して胎盤関門を透過し、胎児に移行していることが示唆された。ENT1 による *fluorouracil* の認識性は低く、胎盤関門透過における ENT1 の寄与はほとんどないと考えられる。一方で *ribavirin* については、胎盤関門において ENT1 により輸送されていることを明らかにした。さらに、ヒト胎盤関門とラット胎盤関門の微絨毛膜における ENT の絶対発現量を定量したところ、ENT1 の発現量は、ラットよりもヒトにおいて多いことが明らかとなった。一方で、ENT2 の発現量は、ヒトとラットで同程度であることを明らかにした。このことは、特に *ribavirin* など ENT1 基質薬物の移行性を考える上で貴重な情報といえる。胎盤関門における薬物透過を担う輸送体を明らかにし、そのタンパク発現分子数のデータをヒトとラットで蓄積することは、ヒトでの薬物動態解明が困難な妊婦において、ラットにおける胎児移行性のデータをヒトに外挿する上で必要である。本研究はその端緒となる研究として、胎児に安全で母体に有益な妊娠時薬物治療の推進に資するものである。