

博士学位論文 2021 年度

組織薬物分布に対する  
MDR1 および BCRP 寄与の胎盤・脳関門間比較

慶應義塾大学大学院薬学研究科

藤田 有美

本学位論文は、下記の原著論文をもとに作成され、慶應義塾大学大学院薬学研究科に提出されたものである。

A Fujita, S Noguchi, R Hamada, S Inoue, T Shimada, S Katakura, T Maruyama, Y Sai, T Nishimura, M Tomi: Limited Impact of Murine Placental MDR1 on Fetal Exposure of Certain Drugs Explained by Bypass Transfer between Adjacent Syncytiotrophoblast Layers. *Pharm Res* doi: 10.1007/s11095-022-03165-6. Online ahead of print.

BCRP	Breast cancer resistance protein
$CL_{fm}$	plasmatic clearance in the fetal-to-maternal direction
$CL_{fm,int,all}$	fetus-to-mother intrinsic clearance
$CL_{mf}$	plasmatic clearance in the maternal-to-fetal direction
$CL_{mf,int,all}$	mother-to-fetus intrinsic clearance
$f_{u,fp}$	unbound fraction in the fetal plasma
$f_{u,mp}$	unbound fraction in the maternal plasma
fp	fetal plasma
GD	gestational day
IS	internal standard
$K_{p,brain}$	maternal brain-to-plasma concentration ratio
$K_{p,brain}$ ratio	ratio of $K_{p,brain}$ in <i>Mdr1a/b</i> <sup>-/-</sup> to wild type mice
$K_{p,fp}$	fetal-to-maternal plasma concentration ratio
$K_{p,fp}$ ratio	ratio of $K_{p,fp}$ in <i>Mdr1a/b</i> <sup>-/-</sup> to wild type mice
$K_{p,uu,brain}$	unbound plasma concentration ratio of maternal brain to plasma
$K_{p,uu,fp}$	unbound plasma concentration ratio of fetal plasma to maternal plasma
MDR1	multidrug resistance protein 1
MRP	multidrug resistance-associated protein
MRM	multiple reaction monitoring
MVM	microvillous membrane
OAT	organic anion transporter
OATPs	organic anion transporting polypeptides
OCTN	organic cation / carnitine transporter
$P_{AP2.inf}$	permeability for influx across the apical membrane of SynT-II
$P_{AP2.eff}$	permeability for influx across the apical membrane of SynT-II
$P_{BM1.inf}$	permeability for influx across the basal plasma membrane of SynT-I
$P_{diff}$	permeability due to passive diffusion
$P_{Gj}$	permeability for transfer mediated by gap junctions
$P_{l.eff}$	luminal efflux permeability, excluding MDR1-mediated efflux, at brain capillary endothelial cells
PS	permeability-surface area
$PS_{AP1.eff}$	PS product for efflux across the apical membrane of SynT-I
$PS_{AP1.inf}$	PS product for influx across the apical membrane of SynT-I
$PS_{AP2.eff}$	PS product for efflux across the apical membrane of SynT-II, excluding MDR1-mediated efflux
$PS_{AP2.inf}$	PS product for influx across the apical membrane of SynT-II
$PS_{BM1.eff}$	PS product for efflux across the basal plasma membrane of SynT-I
$PS_{BM1.inf}$	PS product for influx across the basal plasma membrane of SynT-I
$PS_{BM2.eff}$	PS product for efflux across the basal plasma membrane of SynT-II
$PS_{BM1.inf}$	PS product for influx across the basal plasma membrane of

	SynT-II
$PS_{GJ}$	PS product for gap junction-mediated transfer between SynT-I and SynT-II
$PS_{l,eff}$	PS product for luminal efflux, excluding MDR1-mediated efflux, at brain capillary endothelial cells
$PS_{MDR1 \text{ or } BCRP, BBB}$	PS product for efflux mediated by MDR1 at the blood-brain barrier
$PS_{MDR1 \text{ or } BCRP, PB}$	PS product for efflux mediated by MDR1 at the placental barrier
$R_{P/B}$	placental barrier-to-blood brain barrier conversion ratio of MDR1 contribution per single MDR1 molecule
$R_{P/C}$	placental barrier-to- <i>in vitro</i> MDR1A cell conversion ratio of MDR1 contribution per single MDR1 molecule
SRM	selected reaction monitoring
SynT	syncytiotrophoblasts

## 目次

第一章 序論 .....	6
第二章 マウスおよびヒト胎盤における MDR1 および BCRP の発現分子数解析 .....	10
2-1 緒言 .....	10
2-3 考察 .....	14
第三章 MDR1 および BCRP 基質薬物の胎児血と脳組織分布における MDR1 および BCRP の寄与比較 .....	16
3-1 緒言 .....	16
3-4 考察 .....	19
3-4-1 Paclitaxel と digoxin の $K_{p,fp}$ と $K_{p,brain}$ 比較 .....	19
3-4-2 Genistein および Dantrolene の $K_{p,fp}$ と $K_{p,brain}$ 比較 .....	20
3-4-3 速度論モデルを用いた MDR1 および BCRP 基質薬物の胎盤関門と血液脳関門における MDR1 および BCRP の寄与比較 .....	21
3-4-4 RP/B および RP/C に対する胎児での薬物代謝クリアランスの影響 .....	26
3-4-5 Paclitaxel および Digoxin の妊娠期別 $K_{p,uu,fp}$ .....	28
3-4-6 ヒト胎盤での $K_{p,ratio}$ 予測 .....	30
第四章 結論 .....	32
実験の部 .....	35
引用文献 .....	41
謝辞 .....	52

## 第一章 序論

女性のライフスタイルの多様化によって、初産年齢の高齢化が進み、また乳癌や子宮頸癌における罹患年齢の若年化に伴って悪性腫瘍を合併した合併症妊娠は増加してきている。米国で行われたコホート研究によると、2002年では悪性腫瘍合併妊娠の割合が妊婦 1000 人あたり 0.75 人の割合であったのに対し、2012年には妊婦 1000 人あたり 1.39 人であり、10年間で発症率が約 2 倍に増加している(Cottreau et al. 2019)。最も発症率が高い癌腫は乳癌であり、妊娠関連乳癌の約 7 割で診断時の悪性度がステージ II と III と比較的進行度が高い(de Haan et al. 2018)。妊娠期であっても化学療法を含む標準的がん治療を受けた患者では非妊娠時と同程度の生存率であり(Stensheim et al. 2009)、母体保護の観点では妊娠期であっても積極的治療が好まれる。

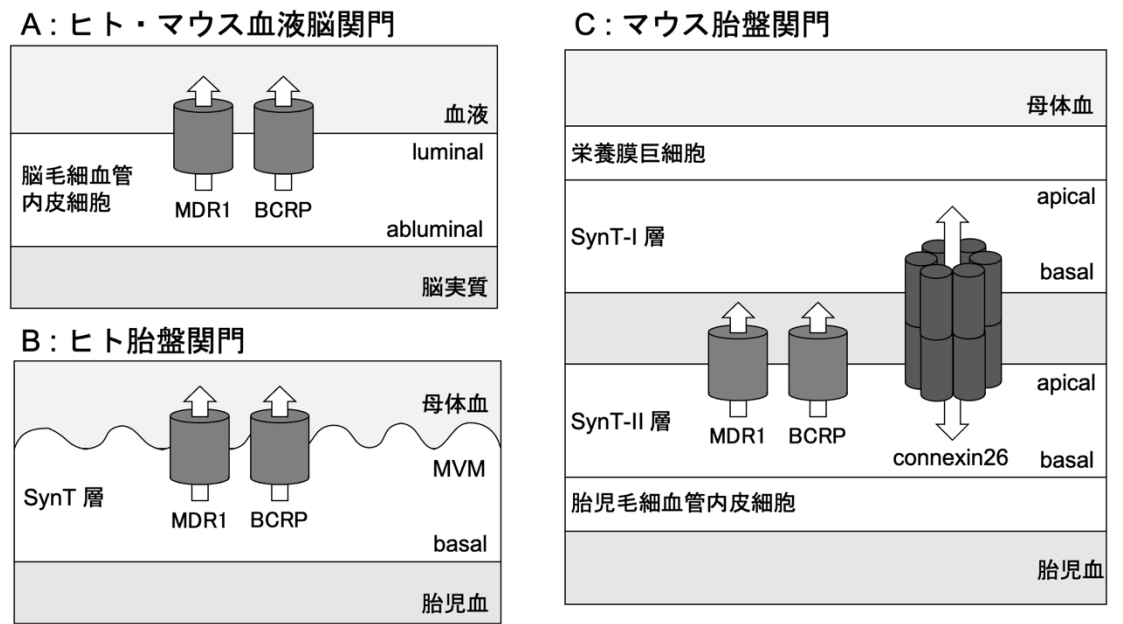
一方で、化学療法に用いられる抗がん剤は細胞増殖に関わる因子をターゲットにしているため胎児の発育遅延や催奇形性といった胎児毒性への懸念があるが、使用経験が少ないことよりエビデンス不足である。そのため、妊婦やその家族のみならず医療従事者においても妊娠期悪性腫瘍患者に対して化学療法を行うことに葛藤が生じやすい。

母体薬物治療による胎児毒性を考慮する上で薬物の胎児移行性は重大な要素である。薬物の胎児毒性や胎児移行性は非臨床試験によって評価され、動物種としては齧歯類が汎用されている。胎盤の構造は動物種によって異なり、齧歯類で得られた結果をそのままヒトに外挿することは難しい。そのため、ヒトにおける胎児薬物移行を齧歯類から予測するには、齧歯類とヒトでの胎児薬物分布機構における比較評価が必要である。

血液脳関門や胎盤関門には抗がん剤などを組織外に汲み出す輸送体として multidrug resistance protein 1 (MDR1) と breast cancer resistance protein (BCRP) が発

現する(Durmus, Hendrikx, and Schinkel 2015)。ヒト脳では、MDR1 と BCRP は血液脳関門の実体である脳毛細血管内皮細胞の luminal membrane に発現している(Aronica et al. 2005; Virgintino et al. 2002) (Fig. 1A)。一方でヒト胎盤関門では、MDR1 と BCRP は多核化した合胞体栄養膜細胞層 (SynT) 単層の刷子縁膜 (MVM) に発現している(Kliman et al. 2018; Szilagyi et al. 2017) (Fig. 1B)。つまり、ヒト胎盤と血液脳関門のいずれにおいても、MDR1 と BCRP は循環血流に接するように発現しており、両者ともに基質薬物を循環血中に汲み出すことで胎児や脳への薬物分布抑制に寄与している。

齧歯類の脳毛細血管内皮細胞では MDR1 と BCRP はヒト同様に luminal membrane に発現しており、MDR1 と BCRP は循環血流に接している(Beaulieu et al. 1997; Lee et al. 2005) (Fig. 1A)。一方、齧歯類胎盤はヒト胎盤と構造的に異なり、ヒト胎盤 SynT 層が一層であるのに対し、齧歯類胎盤の SynT 層は母体血側 SynT-I と胎児血側 SynT-II の二層で構成される。これまでに我々は、齧歯類胎盤において MDR1 と BCRP が SynT-II の apical membrane に発現していることを明らかにしている(Akashi et al. 2016) (Fig. 1C)。つまり、齧歯類胎盤において MDR1 と BCRP は SynT-I と SynT-II の間に発現し、ヒト胎盤や脳とは異なり MDR1 と BCRP は循環血流に接していない。



**Fig. 1** ヒトとマウスの血液脳関門および胎盤関門における MDR1 と BCRP の局在

血液脳関門において、マウスとカニクイザルの脳毛細血管内皮細胞における MDR1 の発現量をそれぞれ算出することで、MDR1 基質薬物のマウス脳移行性からカニクイザル脳移行性の予測が可能であることが報告されている(Uchida et al. 2014)。MDR1 および BCRP の発現量とその輸送活性が相関することを示す報告は多く(Liu et al. 2017; Shirasaka, Sakane, and Yamashita 2008; Tachibana et al. 2010)、胎盤関門においても血液脳関門同様に MDR1 および BCRP の発現分子数を算出することで種差の定量的評価が可能であるように思われる。しかし、齧歯類胎盤において MDR1 と BCRP の局在はヒト胎盤とは異なるため、MDR1 と BCRP 発現量の種差と基質薬物の胎児移行抑制活性の種差が相関しない可能性がある。

齧歯類胎盤の SynT-I と SynT-II は connexin26 で構成された gap 結合にて結合している (Coan, Ferguson-Smith, and Burton 2005; Shin et al. 1996) (Fig. 1C)。Connexin26 で形成された gap 結合は最小内径が 1.4 nm の細胞間チャネルを形成しており、イオンやセカンドメッセンジャー、代謝物質などの低分子を透過さ



せて細胞間情報伝達を担っている(Maeda et al. 2009)。したがって、SynT-I と SynT-II 間での物質の授受は細胞膜および gap 結合を介した経路が存在し、薬物は gap 結合チャンネルを透過することで MDR1 や BCRP による排出機構を迂回することが可能となる。実際、欠損マウスを用いた解析において、胎盤 MDR1 は paclitaxel や digoxin、saquinavir の胎児分布を抑制していることが示されている(Smit et al. 1999)。それにもかかわらず、norbuprenorphine では同一個体において MDR1 による脳移行抑制が示される一方、胎児移行における MDR1 の関与は示されていない(Liao et al. 2017)。

本研究では、齧歯類胎盤 MDR1 と BCRP の局在における独自性が組織分布抑制活性に与える影響を定量的に評価することを目的とした。目的達成のため、マウス血液脳関門とマウス胎盤関門における MDR1 と BCRP の組織薬物分布制御機能を定量的に比較することで、MDR1 と BCRP の局在の違いが基質薬物の胎児移行抑制における MDR1 と BCRP 寄与に与える影響を明らかにすることを目指した。まず、マウス胎盤迷路部およびヒト胎盤 MVM の細胞膜画分中 MDR1 および BCRP 発現量を LC-MS/MS を用いて定量した(第二章)。続いて、Mdr1a/b および Bcrp 欠損妊娠マウスを用い、胎児血および脳への薬物分布抑制における MDR1 および BCRP の寄与を定量し、MDR1 および BCRP 単分子当たりの薬物分布抑制能を脳関門と胎盤関門で比較した(第三章)。

## 第二章 マウスおよびヒト胎盤における MDR1 および BCRP の発現

### 分子数解析

#### 2-1 緒言

MDR1 と BCRP について、タンパク質発現量は MDR1 と BCRP の輸送活性と相関することが報告されている(Liu et al. 2017; Shirasaka et al. 2008; Tachibana et al. 2010)。MDR1 と BCRP 以外の輸送体に関しても、OCTN1 と MRP1 についてタンパク質発現量と輸送活性の間に強い相関が見られたことが報告されており(Sakamoto et al. 2016)、様々な輸送体について、タンパク質発現量とその輸送活性が相関することが報告されている。輸送体のタンパク質発現量は輸送活性と相関することから、輸送体機能の臓器間、動物種間差異は、比較対象となるそれぞれの細胞の単位表面積あたり輸送体タンパク質発現分子数から推定することが可能である。

これまでに、MDR1 輸送活性の *in vitro* から *in vivo* への予測が報告されている。マウス脳毛細血管内皮細胞と *Mdr1a* 発現細胞株での MDR1 発現分子数と、*Mdr1a* 発現細胞株と mock 細胞を用いて算出した MDR1 の単分子輸送活性を用いることで、*in vitro* から *in vivo* への輸送活性予測は可能であることが報告されている(Uchida et al. 2011a)。また、マウスとカニクイザルの脳毛細血管内皮細胞における MDR1 のタンパク質発現分子数と MDR1 基質薬物のマウス脳移行性から、カニクイザルでの脳移行性の予測が可能であることが報告されている(Uchida et al. 2014)。したがって、胎盤関門における MDR1 と BCRP の機能を定量的に血液脳関門と比較するにあたり、両関門にて輸送体が機能的に発現する細胞膜での MDR1 と BCRP の発現量情報は必須である。

ヒト胎盤において MDR1 と BCRP の発現量解析は mRNA とタンパク質レベルで発現量解析が行われている。ABCB1 の妊娠 7-13 週および 24-35 週における発現量は満期の発現量の 2 倍と、妊娠が進むに連れ mRNA 発現量が減少していた (Sun et al. 2006)。抗体を用いたタンパク質発現量解析も同様に妊娠満期に近づくにつれて発現量が減少している (Mathias, Hitti, and Unadkat 2005; Sun et al. 2006)。また、2020 年に Anoshchenko らによってヒト胎盤を用いて妊娠期別の MDR1 と BCRP の発現分子数が報告されており、MDR1 発現量は第一三半期では 2.16 fmol/ $\mu\text{g}$ \_protein、第二三半期では 1.40 fmol/ $\mu\text{g}$ \_protein、妊娠満期では 0.67 fmol/ $\mu\text{g}$ \_protein であった (Anoshchenko et al. 2020)。これらの発現量変動からヒト胎盤における MDR1 機能は妊娠進行に伴って減少すると考えられている。

マウス MDR1 は MDR1A と MDR1B の 2 つのアイソフォームが存在する。マウス胎盤では MDR1A と MDR1B の両者が発現しており、妊娠 (GD) 9.5 日目や GD12.5 では MDR1A に比べ MDR1B mRNA 発現量の方が多い (Kalabis et al. 2005; Petropoulos et al. 2007)。MDR1A の mRNA 発現は妊娠進行で変動しない一方で、MDR1B は出産が近づくにつれ mRNA 発現量が減少する (Kalabis et al. 2005)。MDR1 タンパク質の妊娠進行に伴う発現変動は western blotting 法を用いて検討されており、妊娠進行に伴い発現量が減少することが報告されている (Kalabis et al. 2005; Zhang et al. n.d.)。GD 9.5 から 15.5 で MDR1A に比べ MDR1B の mRNA 発現量が多いこと、MDR1B の mRNA 発現量変動と MDR1 タンパク質発現量変動が同様の推移を示していることから、マウス胎盤では MDR1B が主要な発現であるとされてきた。一方、2017 年に Liao らが GD 14.5 妊娠マウス胎盤を用いて MDR1 の発現分子数を測定している (Liao et al. 2017)。この報告では、MDR1A と MDR1B は同程度の発現量であり、他の妊娠期については不明であるが、少なくとも GD14.5 では MDR1 の主要な発現は MDR1B ではない可能性がある。

ヒト胎盤における ABCG2 は、妊娠 28 週において妊娠 39 週の 2 倍発現しており、妊娠進行に伴って ABCG2 発現量は減少するという報告がある (Meyer Zu Schwabedissen et al. 2006)。一方で ABCG2 量は妊娠期を通して常に一定であるという報告も存在する (Yeboah et al. 2006)。Anoshchenko らのヒト胎盤を用いた妊娠期別の BCRP タンパク質発現分子数報告では、BCRP 発現量は第一三半期では 2.39 fmol/ $\mu$ g\_protein、第二三半期では 1.88 fmol/ $\mu$ g\_protein、妊娠満期では 1.08 fmol/ $\mu$ g\_protein であり、妊娠進行に伴い BCRP 発現量は減少する (Anoshchenko et al. 2020)。一方で、抗体を用いた解析において BCRP タンパク質発現量は第一三半期、第二三半期、妊娠満期で有意な発現量変動を示さない報告もある (Mathias, Hitti, and Unadkat 2005)。さらに第一三半期や第二三半期よりも妊娠満期でタンパク質発現量が増加する報告も存在し (Yeboah et al. 2006)、BCRP の発現量変動は一定の見解が得られていない。マウス胎盤における BCRP タンパク質発現は western blotting 法を用いて解析されており、GD15.5 が最大となるような一過性の発現変動を示す報告がある (Wang et al. 2006a)。一方、GD15.5 が最小となるような一過性の変動を示す報告があり (Kalabis et al. 2007)、ヒト胎盤同様に一定の見解を得られていない。

このように、ヒトおよびマウス胎盤に発現する MDR1 と BCRP は妊娠期によって発現量変動しており、それに伴い、各妊娠期で MDR1 および BCRP の機能は異なる可能性がある。

そこで、本章では妊娠期ごとの MDR1 および BCRP の機能を血液脳関門と比較するため、GD13.5、15.5、17.5 におけるマウス胎盤での MDR1A、MDR1B、および BCRP 発現量を胎盤迷路部での細胞膜画分を用いて LC-MS/MS によって定量し、マウス脳毛細血管内皮細胞での MDR1A および BCRP 発現量 (Uchida et al. 2013a) と比較した。さらに、ヒトとマウスでの種差を検討するため、満期ヒ

ト胎盤 MVM における MDR1 および BCRP 発現量についても定量を行った。

## 2-3 考察

本研究では、LC-MS/MS を用いて胎盤関門における MDR1A と MDR1B、BCRP タンパクの発現分子数を定量し、これら輸送体の妊娠進行に伴う発現量推移を明らかにした。

本研究結果で得られた GD15.5 から 17.5 にかけての総 MDR1 発現量も既報同様に減少しており、この発現量変動は MDR1B の発現量減少によるものといえる。GD17.5 において、MDR1A のタンパク質発現量は総 MDR1 発現量の 80% を占めている。Mdr1a 欠損 CF-1 マウスにおいて avermectin B1a のフォトアイソマーの胎児分布や感受性が上昇することが報告されていることもあり(Lankas et al. 1998)、GD17.5 において MDR1A は胎盤での MDR1 の主要な発現であることが考えられる。

一方、GD13.5 と 15.5 での MDR1A 発現は総 MDR1 発現量の 46% と 64% であった。既報で報告されている GD14.5 胎盤における MDR1A と MDR1B の発現分子数も総膜タンパク質あたり 0.5 fmol/ $\mu$ g<sub>protein</sub> 以下であり(Liao et al. 2017)、本章で得られた結果と同程度である。GD15.5 での MDR1B mRNA 発現量は MDR1A の約 2 倍であったため(Kalabis et al. 2005)、mRNA では MDR1B 発現の方が高い発現レベルである。しかし、タンパク質発現では、GD14.5 から 15.5 では MDR1A と MDR1B は同程度の発現である。

BCRP は GD15.5 が最大となるように一過性の発現変動を示し (Fig. 2)、GD15.5 は GD17.5 の 3.9 倍の発現量であった。妊娠進行に伴う BCRP の発現変動について、これまでの報告では western blotting 法にて発現量解析を行っていたが(Kalabis et al. 2007; Wang et al. 2006b)、本研究では BCRP に特異的なペプチド断片を LC/MS/MS によって測定することにより BCRP 発現量を定量しており、既報での解析手法とは異なる。本章で得られた BCRP の発現量変動は

western blotting 法で行われた一部の報告と合致していた(Wang et al. 2006a)。

胎盤関門の SynT-II apical membrane における推定 MDR1 発現量は血液脳関門における脳毛細血管内皮細胞 luminal membrane の約 1/4~1/3 程度であった一方で BCRP 発現量は約 3 倍から同程度の発現であり、マウス胎盤関門と血液脳関門の MDR1 また BCRP 機能が相関すると仮定すると、胎児薬物分布における MDR および BCRP の制御機能は血液脳関門のそれぞれ約 1/4、および約 3 倍~同程度であることが予想される。

本章で得られたヒト胎盤 MVM 画分中の MDR1 および BCRP 発現分子数は、既報でのヒト胎盤総細胞膜画分中の MDR1 発現分子数 0.67 fmol/ $\mu$ g<sub>protein</sub> (最小値:0.4、最大値:1.5) および BCRP 発現分子数 1.09 fmol/ $\mu$ g<sub>protein</sub> (最小値:0.3、最大値:2.0) と比較してやや低い(Anoshchenko et al. 2020)。ヒト胎盤 MVM 画分中の MDR1 および BCRP タンパク質量を GD17.5 における妊娠マウス SynT-II 細胞の apical membrane における推定 MDR1 および BCRP タンパク質量と比較すると、それぞれ 4.0%と 13%に過ぎない。また、MVM の膜表面積は基底膜の約 6 倍であるため(Teasdale and Jean-Jacques 1988)、既報での全細胞膜画分の大部分は MVM 膜であることを考えると、既報における MDR1 と BCRP タンパク質量は GD17.5 マウス胎盤での発現量のそれぞれ 9.6%と 21%である。これらのことより、満期ヒト胎盤関門における MDR1 および BCRP 発現量はマウスよりも低いことが示唆された。

## 第三章 MDR1 および BCRP 基質薬物の胎児血と脳組織分布における MDR1 および BCRP の寄与比較

### 3-1 緒言

定常状態における胎児母体血漿中非結合型薬物濃度比 ( $K_{p,uu,fp}$ ) と脳血漿中非結合型薬物濃度比 ( $K_{p,uu,brain}$ ) は、それぞれ母体から胎児への透過固有クリアランス ( $CL_{mf,int,all}$ ) の胎児母体への透過固有クリアランス ( $CL_{fm,int,all}$ ) と胎児での代謝クリアランスの和に対する比、および血漿から脳への透過固有クリアランスの脳から血漿への透過固有クリアランスと脳での代謝クリアランスの和に対する比を表している (Hammarlund-Udenaes et al. 2008)。MDR1 や BCRP が機能している場合、胎児胎盤組織からの積極的な排出が起こるため、 $CL_{mf,int,all}$  に比べ  $CL_{fm,int,all}$  が大きくなるため透過固有クリアランス比は小さくなり、MDR1 あるいは BCRP 基質薬物の  $K_{p,uu,fp}$  値は 1 を下回る。

マウス *Mdr1a* 過剰発現 LLC-PK1 単細胞層と LLC-PK1 細胞層の basal-to-apical 輸送に対する apical-to-basal 輸送の比から見かけの MDR1A 排出輸送寄与 (*in vitro* MDR1 efflux ratio) を算出すると、MDR1 基質薬物の  $K_{p,uu,brain}$  は脳での MDR1 発現分子数と *in vitro* MDR1 efflux ratio から再構築できることが報告されている (Uchida et al. 2011a)。BCRP についても同様の報告があり (Liu et al. 2017)、*in vivo* での単分子あたりの MDR1 あるいは BCRP 寄与が *in vitro* と同等であると、*in vitro* から *in vivo* への再構築が可能である。

ヒト胎盤では MDR1 および BCRP が血液脳関門同様に直接血流に接しているため、ヒト胎盤においても脳同様に *in vitro* MDR1 efflux ratio あるいは *in vitro* BCRP efflux ratio から *in vivo* への再構築が理論的に可能である。齧歯類胎盤にお



いても、単分子あたりの MDR1 と BCRP の寄与は他の臓器や *in vitro* と変わらないことが予想される。しかし、齧歯類胎盤では connexin26 による gap 結合チャネルを介した薬物の透過が胎児分布に大きく影響を与える可能性があるため、見かけの MDR1 あるいは BCRP 寄与が減弱する可能性がある。

ヒトでの胎児薬物移行性は齧歯類を用いた動物実験によって得られたデータから判断される場合が多いため、ヒトにおける胎児薬物移行性を齧歯類から予測するには、齧歯類とヒトでの胎児薬物分布抑制における MDR1 および BCRP 寄与の種差を定量評価することが求められる。しかし、ヒトでは MDR1 あるいは BCRP の有無による胎児移行性比較をすることはできないため、ヒトと齧歯類の胎盤関門における MDR1 および BCRP 寄与を直接比較することは困難である。

血液脳関門はヒト胎盤同様に MDR1 および BCRP が直接血流に接しており、MDR1 および BCRP の機能が最もよく知られている組織である。そこで、本章では、MDR1 および BCRP の機能をマウスでの血液脳関門と胎盤関門で定量的に比較することで、マウス胎盤関門の構造が MDR1 と BCRP の薬物胎児分布制御への寄与に与える影響を明らかにすることを目的とした。マウス血液脳関門では *in vitro* での MDR1 輸送活性と血液脳関門での MDR1 の寄与が相関することが報告されている(Uchida et al. 2011a)。本章では、*in vitro* での MDR1 と BCRP の輸送活性と胎盤関門での胎児薬物移行抑制における MDR1 と BCRP の寄与も比較評価することとした。なお、評価に用いた基質薬物は、第一に *Mdr1a/b* あるいは *Bcrp* 欠損マウスを用いた脳組織移行試験にて MDR1 や BCRP が脳移行を抑制していることが報告され、MDR1 あるいは BCRP 過剰発現細胞株を用いた透過試験においても MDR1 や BCRP を介した輸送が認められたものを選択した。さらに、各輸送体で分子量が同程度で pH7.4 での logD 値、分子の立体構造が異

なる薬物 2 種類ずつに絞り、MDR1 の基質薬物では paclitaxel と digoxin、BCRP 基質薬物では genistein と dantrolene を用いた。

$K_{p,uu,fp}$  は胎児母体血漿中薬物濃度比 ( $K_{p,fp}$ ) と胎児と母体の非結合型分率比 ( $f_{u,fp}/f_{u,mp}$ ) の積で算出することができる。本章では、まず野生型および Mdr1a/b 欠損、Bcrp 欠損妊娠マウスを用いて  $K_{p,fp}$  と  $K_{p,brain}$  を測定した。Digoxin と genistein、dantrolene はアルブミンに結合し (Capomacchia, Vallner, and Boone 1978; Evered 1972; Vallner 1977)、paclitaxel はアルブミンと  $\alpha$ -酸性糖タンパク質に結合する (Kumar et al. 1993)。血漿中アルブミン濃度や総タンパク質濃度において野生型と Mdr1a/1b あるいは Bcrp 欠損マウスとの間で差がないことが報告されているため (Jonker et al. 2002; Schinkel, Mayer, Wagenaar, Carla A.A.M. Mol, et al. 1997)、MDR1 や BCRP の欠損マウスにおける  $f_{u,fp}/f_{u,mp}$  は野生型マウスと変わらないものとみなした。そこで本章では、 $K_{p,fp}$  と  $K_{p,brain}$  を用いて胎盤関門での胎児薬物抑制における MDR1 と BCRP の寄与を血液脳関門での寄与と比較検討した。さらに、*in vitro* MDR1 efflux ratio および *in vitro* BCRP efflux ratio を用いて胎盤関門での胎児薬物制御における MDR1 と BCRP の寄与を *in vitro* と *in vivo* で比較検討した。

### 3-4 考察

#### 3-4-1 Paclitaxel と digoxin の $K_{p,fp}$ と $K_{p,brain}$ 比較

Paclitaxel を 48 時間持続投与し、GD15.5 あるいは 17.5 における野生型と Mdr1a/b 欠損妊娠マウスにおける  $K_{p,fp}$  と  $K_{p,brain}$  を算出した。Mdr1a/b 欠損妊娠マウスでの paclitaxel の  $K_{p,fp}$  は野生型に比べ統計的に有意な増加を示した。既報において、Mdr1a/b 欠損マウスでは投与 1 時間後の母体血漿に対する胎児組織の paclitaxel 濃度比が 16 倍高いことが報告されている (Smit et al. 1999)。既報での胎児組織を用いて観察された Mdr1a/b 欠損妊娠マウスの胎児分布の増加は、胎児血漿を用いた本研究の増加分に比べて大きい。胎児組織を用いた評価では、胎児組織に発現する MDR1 の影響を排除することはできない (Han, Gao, and Mao 2018)。したがって、本研究で求めた  $K_{p,fp}$  ratio は胎盤における MDR1 の影響を正確に推定するためのより良い指標となる。

Paclitaxel において、胎盤関門と血液脳関門の MDR1 発現量差と  $K_p$  ratio の差は同程度であり、胎盤関門における MDR1 の胎児薬物分布抑制寄与は血液脳関門での寄与と相関する。

Digoxin を 72 時間持続投与し、GD15.5 あるいは 17.5 における野生型と Mdr1a/b 欠損妊娠マウスにおける  $K_{p,fp}$  と  $K_{p,brain}$  を算出した。Digoxin の MDR1 の有無による  $K_{p,fp}$  変化量は僅かであった。本章結果は、Mdr1a/b 欠損マウスでは投与 4 時間後および 24 時間後の母体血漿に対する胎児組織の digoxin 濃度比が 2 倍増加し (Smit et al. 1999)、Mdr1a 欠損マウスでは投与 4 時間後の digoxin の脳血漿濃度比が 19 倍増加した (Schinkel et al. 1995) というこれまでの報告結果と相関し、digoxin 胎児分布に対する胎盤 MDR1 の寄与は血液脳関門に比べて小さいことが定量的に裏付けられた。

### 3-4-2 Genistein および Dantrolene の $K_{p,fp}$ と $K_{p,brain}$ 比較

Genistein を 2 時間持続投与し、GD15.5 あるいは 17.5 における野生型と Bcrp 欠損妊娠マウスにおける  $K_{p,fp}$  と  $K_{p,brain}$  を算出した。

既報にて Bcrp 欠損マウスでの Genistein の  $K_{p,brain}$  は野生型の 9 倍に増加し、GD14.5 Bcrp 欠損妊娠マウスの胎児組織/母体血漿中 genistein 濃度比は野生型に比べて 2 倍に増加することが報告されており (Enokizono, Kusuvara, and Sugiyama 2007)、genistein の胎児分布に対する胎盤 BCRP の寄与は血液脳関門での寄与よりも小さい点は過去の報告と相関していた。

Dantrolene を 2 時間持続投与し、GD15.5 における野生型と Bcrp 欠損妊娠マウスにおける  $K_{p,fp}$  と  $K_{p,brain}$  を算出した。また、 $K_{p,fp}$  については 24 時間持続投与後の GD15.5 野生型と Bcrp 欠損妊娠マウスにおいても評価した。Dantrolene の  $K_{p,brain}$  は野生型に比べ Bcrp 欠損妊娠マウスにて 6 倍に増加した一方で、 $K_{p,fp}$  は 2 時間および 24 時間持続投与ともに BCRP の有無によって変動しなかった。マウス胎盤関門において BCRP の dantrolene 排出輸送体としての機能は観察されなかった。Genistein と dantrolene は MDR1 の基質ではなく BCRP に特異的な基質であることが報告されている (Enokizono et al. 2008; Kodaira et al. 2011)。胎盤における BCRP 発現量は血液脳関門の GD15.5 で 3 倍、GD17.5 で同程度であった。輸送体のタンパク質発現量は輸送活性と相関することから、胎盤における BCRP の胎児薬物分布抑制への寄与も GD15.5 で 3 倍に、GD17.5 で同程度であることが予想されるが、genistein も dantrolene も胎盤関門における BCRP 寄与は血液脳関門の寄与よりも小さかった。つまり、マウス胎盤関門において、genistein と dantrolene の BCRP による排出輸送を減弱させる輸送の存在が示唆された。

### 3-4-3 速度論モデルを用いた MDR1 および BCRP 基質薬物の胎盤関門と血液脳関門における MDR1 および BCRP の寄与比較

胎盤関門における胎児薬物分布抑制への MDR1 と BCRP の寄与が血液脳関門での寄与と一致する場合、 $R_{P/B}$ と $R_{P/C}$ は1に近い値となる。

$$R_{P/B} = \frac{P_{l,eff}}{P_{AP2,eff} + P_{GJ} \times \left(1 + \frac{P_{AP2,inf}}{P_{BM1,inf}}\right)} \simeq 1$$

$$P_{l,eff} \simeq P_{AP2,eff} + P_{GJ} \times \left(1 + \frac{P_{AP2,inf}}{P_{BM1,inf}}\right)$$

$$R_{P/C} = \frac{P_{a,eff}}{P_{AP2,eff} + P_{GJ} \times \left(1 + \frac{P_{AP2,inf}}{P_{BM1,inf}}\right)} \simeq 1$$

$$P_{a,eff} \simeq P_{AP2,eff} + P_{GJ} \times \left(1 + \frac{P_{AP2,inf}}{P_{BM1,inf}}\right)$$

これらの式における $P_{GJ}$ 以外の透過性は、単純拡散 ( $P_{diff}$ ) あるいは担体介在輸送による透過性を表している。

Paclitaxel の $R_{P/B}$ と $R_{P/C}$ は1に比較的近い。そのため、 $P_{l,eff}$ や $P_{a,eff}$ と $P_{AP2,eff} + P_{GJ} \times \left(1 + \frac{P_{AP2,inf}}{P_{BM1,inf}}\right)$ が同程度となり、 $PS_{AP2,eff}$ を大きくするような担体介在輸送や $P_{GJ}$ の影響をあまり受けていないと考えられる。

一方、胎盤関門における胎児薬物分布抑制への MDR1 と BCRP の寄与に比べて血液脳関門における寄与の方が大きい場合、 $R_{P/B}$ と $R_{P/C}$ は1を大きく下回る。

$$R_{P/B} = \frac{P_{l,eff}}{P_{AP2,eff} + P_{GJ} \times \left(1 + \frac{P_{AP2,inf}}{P_{BM1,inf}}\right)} \ll 1$$

$$P_{l,eff} \ll P_{AP2,eff} + P_{GJ} \times \left(1 + \frac{P_{AP2,inf}}{P_{BM1,inf}}\right)$$

$$R_{P/C} = \frac{P_{a,eff}}{P_{AP2,eff} + P_{GJ} \times \left(1 + \frac{P_{AP2,inf}}{P_{BM1,inf}}\right)} \ll 1$$

$$P_{a.\text{eff}} \ll P_{\text{AP2.eff}} + P_{\text{GJ}} \times \left(1 + \frac{P_{\text{AP2.inf}}}{P_{\text{BM1.inf}}}\right)$$

胎盤関門での BCRP の寄与が見られず  $R_{\text{P/B}}$  と  $R_{\text{P/C}}$  を算出できなかった dantrolene や、 $R_{\text{P/B}}$  と  $R_{\text{P/C}}$  の小さかった digoxin や genistein では  $P_{\text{l.eff}}$  や  $P_{\text{a.eff}}$  よりも  $P_{\text{AP2.eff}} + P_{\text{GJ}} \times \left(1 + \frac{P_{\text{AP2.inf}}}{P_{\text{BM1.inf}}}\right)$  の方が大きくなる。つまり、digoxin と genistein、dantrolene では、 $P_{\text{AP2.eff}}$  を大きくする SynT-II の apical membrane における担体介在輸送、あるいは SynT-I と SynT-II 間の gap 結合を介した輸送か  $P_{\text{AP2.inf}}$  を大きくする SynT-II の apical membrane における担体介在輸送が存在することが考えられる。

$P_{\text{AP2.eff}}$  を大きくするような担体介在輸送は、SynT-II の apical membrane において排出方向に働く輸送である。Digoxin は薬物透過試験において MDR1 の特異的基質として頻繁に使用されており、また BCRP の基質ではないことが報告されている(Uchida et al. 2011a)。そのため、digoxin 輸送におけるその他の排出輸送体関与は不明であり、 $P_{\text{AP2.eff}}$  を増加させる排出輸送体の候補を見つけることは困難である。Genistein と dantrolene は BCRP の特異的基質であり、MDR1 の基質ではない(Enokizono et al. 2007; Kodaira et al. 2010)。Genistein と dantrolene 輸送においても、その他の排出輸送体関与は不明であり  $P_{\text{AP2.eff}}$  を増加させる排出輸送体の候補を見つけることは困難である。

$P_{\text{GJ}}$  や  $P_{\text{AP2.eff}}$  の他に  $P_{\text{AP2.inf}}$  が大きくなると、 $P_{\text{l.eff}}$  や  $P_{\text{a.eff}}$  よりも  $P_{\text{AP2.eff}} + P_{\text{GJ}} \times \left(1 + \frac{P_{\text{AP2.inf}}}{P_{\text{BM1.inf}}}\right)$  の方が大きくなる。Digoxin では、OATPs による取込み輸送が報告されているが(Nader and Foster 2014; Sugiyama et al. 2003; Terao et al. 2000)。OATPs によって  $PS_{\text{AP2.inf}}$  が増加すれば、 $K_{\text{p,uu,fp}}$  も増加する。しかし、本章結果では、Mdr1a/b 欠損妊娠マウスでは digoxin の  $K_{\text{p,uu,fp}}$  は 1 未満である。そのため、

digoxin の  $P_{AP2.inf}$  に対する OATPs の影響は小さい可能性が高い。Genistein は MRP1 と OATP1B1 の輸送(Karlgren et al. 2012)を、dantrolene は OAT2 と OAT3 の輸送(Burckhardt et al. 2016)をそれぞれ阻害することが報告されているが、これら輸送体の基質になるといった報告はなく、 $PS_{AP2.inf}$  を大きくするような取込み輸送体を genistein と dantrolene で見つけるのは困難である。以上のことから、SynT-II の apical membrane に digoxin や genistein、dantrolene の排出あるいは取込み輸送体が存在し、 $PS_{AP2.eff}$  や  $PS_{AP2.inf}$  を十分に増加させて  $R_{P/B}$  や  $R_{P/C}$  を減少させている可能性は低いと考えられる。一方、胎盤迷路部の透過型電子顕微鏡写真で、SynT-I と SynT-II の間の細胞膜に沿って connexin26 による gap 結合が頻繁に観察されることから、digoxin や genistein、dantrolene の輸送に  $P_{GJ}$  が大きく寄与していると考えるのは妥当である(Coan et al. 2005; Shin et al. 1996)。

$P_{AP2.eff}$ 、 $P_{AP2.inf}$ 、 $P_{BM1.inf}$ 、 $P_{l.eff}$ 、 $P_{a.eff}$  が専ら単純拡散に基づくと仮定すると、いずれも  $P_{diff}$  と等しくなり、 $R_{P/B}$  および  $R_{P/C}$  は次のように簡単に表すことができる。

$$(式 33) \quad R_{P/B} \text{ and } R_{P/C} = \frac{1}{1 + 2 \frac{P_{GJ}}{P_{diff}}}$$

この式に基づけば、胎盤の MDR1 や BCRP が薬物の胎児分布に与える影響は、SynT-I と SynT-II 間の gap 結合を通る透過性と薬物の単純拡散に大きく影響され、gap 結合を介した透過性が単純拡散による膜透過性に対して大きいほど、胎盤関門における MDR1 や BCRP の寄与が血液脳関門や *in vitro* efflux ratio よりも減少することが予想された。

本研究で用いた digoxin や genistein、dantrolene 以外の薬物では、妊娠マウスにおいて norbuprenorphine の母体脳と胎児への分布に及ぼす MDR1 の影響に違いがあることが報告されている。胎児組織/母体血漿の AUC 比は変化しなかつ

たが、母体脳/母体血漿の AUC 比は Mdr1a/b 欠損マウスで 34 倍高くなった (Liao et al. 2017)。一方、saquinavir の脳および胎児への分布における MDR1 の寄与は、投与 15 分後および 30 分後に Mdr1a/b 欠損マウスで野生型に比べ胎児組織/母体血漿濃度比が 5~7 倍高く (Smit et al. 1999)、投与 4 時間後での Mdr1a 欠損マウスで脳/血漿濃度比は野生型より 7 倍高く (Kim et al. 1998)、脳と胎盤で MDR1 の寄与が類似した値をとることが別々の論文で報告されている。したがって、digoxin や genistein、dantrolene、norbuprenorphine は paclitaxel や saquinavir と比較して、gap 結合を介した透過性が大きい、あるいは単純拡散透過性が小さいと推察される。

Gap 結合は、1kDa までの低分子を透過させることが知られているが、ペプチドや miRNA のような線状構造を持つより大きな分子の移動も可能にする細胞間チャネルである (Zhu et al. 2015)。Connexin26 欠損マウスで観察された胎児へのグルコース移行性の低下は (Gabriel et al. 1998)、connexin26 による gap 結合が SynT-I と SynT-II 間の物質輸送に重要な役割を果たしているという考えを支持するものである。ヒトの connexin2 による gap 結合チャネルの結晶構造によると、6 つのサブユニットのアミノ末端ヘリックスが細胞内孔の入り口に並んで漏斗状構造を形成しており、その最小内径は 1.4 nm である (Maeda et al. 2009)。蛍光色素を用いた研究にて、分子量が 1kDa 以下の小さい薬物であっても、gap 結合の最小内径を通過できる分子量を有するか否かで gap 結合の透過性が変わることが報告されている (Weber et al. 2004)。Weber らが用いた蛍光色素は、Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 594 であり、分子量はそれぞれ 350、570、760 で、全てアニオン性化合物ある。

MarvinSketch 21.16.0 (<https://chemaxon.com/>) を用いると、ファンデルワールス力に基づいた分子の最小投影面積を計算することができる。算出した最小投影



面積より最小投影径を求めると、Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 594 ではそれぞれ 0.9 nm、1.3 nm、および 1.5 nm であった。Alexa Fluor 350 と Alexa Fluor 488 では効率よく connexin26 による gap 結合を透過したが、最小投影径が gap 結合の最少内径である 1.4 nm を越える Alexa Fluor 594 では透過性が大きく減少していた(Weber et al. 2004)。norbuprenorphine の最小投影径は 1.1 nm であり、saquinavir の最小投影径は 1.6 nm である。Digoxin や genistein、dantrolene、norbuprenorphine の最小投影径は connexin26 による gap 結合の最少内径よりも小さく、paclitaxel と saquinavir では最少内径よりも大きい最小投影径を有する。そのため、これらの薬物の分子量はいずれも 1 kDa 以下であるが、paclitaxel や saquinavir と比較して digoxin や genistein、dantrolene、norbuprenorphine の gap 結合に対する透過性は高いことが想定される。

Paclitaxel と saquinavir の pH 7.4 での log D は 6.83 と 4.70 であり、digoxin と norbuprenorphine の pH 7.4 での log D はそれぞれ 1.26 と 1.18 であり、paclitaxel と saquinavir はより脂溶性が高い(Benet, Broccatelli, and Oprea 2011; Jensen et al. 2008)。pH 7.4 における parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) の単純拡散透過性は paclitaxel で 398 cm/s、saquinavir で 114 cm/s と報告されており、digoxin の 0.8 cm/s という値よりもはるかに大きい(Tsinman et al. 2010)。そのため、digoxin、norbuprenorphine は、paclitaxel と saquinavir よりも gap 結合の透過性が高く単純拡散での透過性が低いため、大きな  $P_{GJ}/P_{diff}$  値を持ち、結果として胎盤での MDR1 が digoxin、norbuprenorphine の胎児分布に与える影響は小さいと思われる。

また、dantrolene よりも genistein の方が高い脂溶性を有する。既報にて、logD 値、トポロジカルファンデルワールス極表面積、基本原子のファンデルワールス表面積より推定された genistein と dantrolene の単純拡散による透過クリアラ

ンスは、それぞれ 3.45 mL/min per kg と 1.80 mL/min per kg であり(Kodaira et al. 2014)、 $P_{diff}$  は genistein の方が dantrolene よりも大きいことが予想される。Genistein と dantrolene の最小投影径はそれぞれ 0.9 nm と 0.8 nm であり、両者ともに gap 結合を透過できるため $P_{GJ}$ に大きな差はないと考えられる。Dantrolene の $P_{diff}$ が genistein の $P_{diff}$ よりも大きかったため、dantrolene は、genistein よりも大きな $P_{GJ}/P_{diff}$ 値を持ち、GD15.5 にて genistein では胎児分布における BCRP の寄与が見られた一方で dantrolene の胎児分布における BCRP の寄与が認められなかったと考えられる。しかし、GD15.5 において BCRP の有無で $K_{p,fp}$ に有意差が見られた genistein においても血液脳関門での BCRP 寄与に比べ胎盤関門での寄与は低かった。

#### 3-4-4 $R_{P/B}$ および $R_{P/C}$ に対する胎児での薬物代謝クリアランスの影響

本研究では、胎児組織での薬物代謝は起こらないと仮定して経胎盤輸送速度論モデルを構築したが、胎児肝臓にて薬物代謝クリアランスを無視できない場合においても胎児血漿中薬物濃度は減少するため、 $K_{p,fp}$ は小さくなり、 $R_{P/B}$ および $R_{P/C}$ は小さい値を取る。

Paclitaxel の全身排泄は、ヒト、ラット、マウスにおいて肝臓での代謝で行われる (Sparreboom et al. 1998)。ヒトでの肝代謝は CYP3A4 と CYP2C8 が関与する (Bardelmeijer et al. 2003)。FVB マウスでの paclitaxel 代謝産物は 3'-p-OH-paclitaxel と 6 $\alpha$ -OH-paclitaxel の 2 種類のモノ水酸化代謝物が検出されており (Sparreboom et al. 1996)、これはパクリタキセル投与患者の胆汁 (Monsarrat et al. 1993) や血漿(Huizing et al. 1993)、糞中 (Sparreboom et al. 1995) 及びヒト肝ミクロソーム (Kumar et al. 1994) とヒト肝スライス (Monsarrat et al. 1997) での代謝実験にて主要な paclitaxel 代謝産物として検出されている。そのため、FVB マウスで

もヒト同様の機序で行われる可能性が高い。マウス胎児肝では、ヒト CYP3A4 および CYP2C8 のマウスオルソログを含むほとんどの CYP 酵素の発現量は、ヒト CYP3A7 のマウスオルソログである CYP3A16 を除いて非常に低い (Hart et al. 2009)。ヒト胎児肝ミクロソームにおける CYP3A7 によるレチノイン酸の 4-水酸化反応の触媒作用は、paclitaxel に影響されないため (Chen et al. 2000)、paclitaxel において胎児薬物代謝クリアランスの影響は非常に小さいと考えた。

Digoxin の消失経路は腎臓からの未変化体での排出であるため、胎児における digoxin の代謝は考えにくい。そのため、digoxin の  $R_{P/B}$  および  $R_{P/C}$  の低下は connexin26 によって構成された gap 結合による MDR1 の迂回輸送によって生じたと考えられる。

ヒト、ラット、マウスの血漿中に genistein のグルクロン酸抱合体、硫酸抱合体が主要な genistein 代謝産物として検出されている (Soukup et al. 2016)。*In vitro* においてリコンビナントのヒト UDP グルクロン酸転移酵素 (UGT) および硫酸転移酵素 (SULT) を用いた酵素活性試験にて、genistein は UGT1A1、1A4、1A6、1A7、1A9、1A10 と SULT1A1\*2、1E、2A1 によって代謝されることが報告されている (Doerge et al. 2000)。既報にて、マウス胎児胚盤胞において、UGT1A6 はタンパク質レベルで発現し、UGT 代謝活性は成人肝臓と同程度であったこと (Collier et al. 2014)、GD18.5 マウス胎児肝臓において UGT1A はタンパク質レベルで発現していること (Collier et al. 2012) が報告されている。また、マウス胎児での SULT1A1 発現は不明であるが、妊娠 10-22 週のヒト胎児肝臓では SULT1A1 のタンパク質発現と代謝活性があることが報告されている (Richard et al. 2001)。以上のことから、genistein の  $R_{P/B}$  および  $R_{P/C}$  が 1 を大きく下回った原因として、gap 結合による迂回輸送だけでなく、胎児組織での薬物代謝の影響は否定できない。

Dantrolene の全身排泄はラットにおいて CYP1A1、CYP1A2、CYP3A (Jayyosi et al. 1993)、ヒトにおいてアルデヒドオキシダーゼ 1 (AOX1) による肝代謝の関与が示されている(Amano et al. 2018)。マウス胎児肝臓において AOX1 のタンパク質発現はほとんどないことが報告されている(Terao et al. 2000)。上述の通り、CYP1A1 と CYP1A2 は胎児肝臓に発現していないため(Hart et al. 2009)、CYP1A1、CYP1A2、AOX1 による胎児肝臓での代謝は生じにくいと思われるが、CYP3A についてはサブタイプが判明していないため、胎児肝での CYP3A16 を介した代謝が影響する可能性は排除しきれない。Dantrolene で Bcrp の有無に関わらず  $K_{p,fp}$  に差がなかったのは conexxin26 だけでなく胎児肝での CYP3A16 による代謝の影響を受けているかもしれない。

### 3-4-5 Paclitaxel および Digoxin の妊娠期別 $K_{p,uu,fp}$

野生型妊娠マウスを用いて paclitaxel と digoxin の  $f_{u,fp}$  と  $f_{u,mp}$  を測定し、 $K_{p,fp}$  と掛け合わせて  $K_{p,uu,fp}$  を算出したところ、paclitaxel と digoxin 共に Mdr1a/b 欠損マウスでも  $K_{p,uu,fp}$  は 1 を下回った。

$K_{p,uu,fp}$  は母体に対する胎児の非結合型薬物濃度比で求まるパラメータであり、定常状態において  $CL_{mf,int,all}$  の  $CL_{fm,int,all}$  に対する比に置き換えることができる。Mdr1a/b 欠損マウスにおいて  $K_{p,uu,fp}$  が 1 を下回る場合、MDR1 に加えて  $CL_{fm,int,all}$  を増加させる別の輸送体が存在する可能性も考えられる。式 (9) および式 (19) に基づくと、 $PS_{BM2.inf}$  と  $PS_{AP2.eff}$ 、 $PS_{BM1.inf}$ 、 $PS_{AP1.eff}$  が  $CL_{fm,int,all}$  の増加に寄与する。式 (25) と式 (28) に基づくと、 $P_{BM1.inf}$  は  $R_{P/B}$  と  $R_{P/C}$  の分母側の項に含まれ、 $P_{GJ}$  と逆相関する。つまり、 $PS_{BM1.inf}$  の影響が無視できない場合、 $P_{GJ}$  の影響が小さくなるため、 $R_{P/B}$  と  $R_{P/C}$  は大きくなる。 $R_{P/B}$  と  $R_{P/C}$  が 1 よりもかなり小さい digoxin では  $CL_{fm,int,all}$  増加の要因として  $PS_{BM1.inf}$  は排除される。Digoxin が MDR1

の代表的な基質として一般的に使用されていることを考えると、MDR1 以外に digoxin の排出を担う輸送体候補を見出すことは困難である(Nader and Foster 2014)。そのため、 $PS_{AP2,eff}$ と $PS_{AP1,eff}$ の影響は小さいと考える。また、MDR1 以外の digoxin 輸送研究の多くは、排出輸送体ではなく、有機アニオン輸送ポリペプチド (OATP) の役割に焦点を当てている (Nader and Foster 2014; Sugiyama et al. 2003; Terao et al. 2000)。SynT-II の basal plasma membrane における OATP の局在は不明であるが、digoxin の $CL_{fm,int,all}$ の増加に寄与するのは $PS_{BM2,inf}$ である可能性が最も高いと思われる。

MRP2 は paclitaxel を基質として認識することが知られている(Lagas et al. 2006)。MRP2 はマウス胎盤での発現はごく僅かであり、胎児を包む膜である visceral yolk sac における上皮細胞の apical membrane に局在を示す(Aleksunes, Cui, and Klaassen 2008)。Visceral yolk sac において paclitaxel が排出される場合、胎児血漿中の paclitaxel 濃度は減少するため、 $K_{p,uu,fp}$ は 1 を下回る。そのため、visceral yolk sac に発現する MRP2 が paclitaxel の胎児外排出に関与している可能性がある。

また、Paclitaxel も digoxin も $K_{p,uu,fp}$ は、MDR1 の有無にかかわらず GD15.5 よりも GD17.5 で小さい値を示した。OATPs や MRP2 といった MDR1 以外の輸送体が胎盤関門における digoxin と paclitaxel の胎児分布制御に寄与していることも、両薬物の $K_{p,uu,fp}$ が妊娠の進行とともに減少する一因かもしれない。投与 1 時間後の胎児 digoxin 分布は妊娠進行とともに増加することが報告されているが(Petropoulos et al. 2007)、これは定常状態における分布ではないため、他の物質でも観察されているように母体胎児間で物質の授受を行う SynT 層の単位重量当たりの表面積が妊娠進行に伴って増加することで胎児への移行速度が増加していることを反映している可能性が高い (Coan et al. 2008; Sibley et al. 2004)。定

常状態では薬物の取込み速度と排出速度が平衡に達しているため、SynT 層の単位重量当たりの表面積が増加しても、取込み速度と排出速度が一定であるため胎児血漿中濃度に影響しないと考える。OATPs と MRP2 がそれぞれ digoxin と paclitaxel の  $K_{p,uu,fp}$  の減少に大きく寄与しているかどうかを明らかにするためには、さらなる研究が必要である。

#### 3-4-6 ヒト胎盤での $K_{p,ratio}$ 予測

ヒト胎盤において MDR1 および BCRP が SynT 単層の MVM に局在しているため(Kliman et al. 2018)、digoxin や genistein、dantrolene の胎児への分布については、connexin26 による gap 結合の影響を考慮する必要がないため、ヒトではマウスとは異なり、 $R_{p/B}$ 、 $R_{p/C}$  が 1 に近い値を取ると考えられる。

Digoxin の MDR1 を介した排出輸送活性に種差がないと仮定すると(Takeuchi et al. 2006)、ヒト胎盤 MVM 画分およびマウス脳毛細血管内皮細胞の luminal membrane(Uchida et al. 2013b)あるいは Mdr1a 過剰発現細胞(Uchida et al. 2011a)の MDR1 発現量と本研究の  $K_{p,brain}$  ratio と *in vitro* MDR1 efflux ratio(Uchida et al. 2011b)から推定される digoxin のヒト  $K_{p,fp}$  ratio はマウスとほぼ同程度であった。既報にて、*in vitro* MDR1 efflux ratio と MDR1 分子数から推定された  $K_{p,brain}$  ratio の逆数は  $K_{p,uu,brain}$  と一致することが報告されている(Uchida et al. 2011a, 2014)。ヒトでの妊娠満期における母体胎児間アルブミン濃度差は小さい(KRAUER, DAYER, and ANNER 1984)。そのため、ヒト満期胎盤での  $K_{p,uu,fp}$  は  $K_{p,fp}$  で近似できると仮定すると、分娩時に測定された digoxin の母体血と臍帯血を用いた  $K_{p,fp}$  は 0.77 であり、本章にて推定した digoxin のヒト  $K_{p,fp}$  ratio の逆数と一致していた。一方、ヒトにおける paclitaxel の胎児分布に対する胎盤 MDR1 の寄与は、マウスにおける寄与よりもはるかに小さいと予想される。

本研究により、マウス胎盤関門では、**digoxin** や **genistein**、**dantrolene** などの特定の基質の胎児分布制御への **MDR1** と **BCRP** の寄与は血液脳関門と比較して小さいことが示された。**connexin26** による **gap** 結合を介した 2 つの **SynT** 層間の輸送を含む胎盤関門の速度論モデルにより、胎盤 **MDR1** や **BCRP** の影響は、**gap** 結合の透過性と単純拡散透過性の比に逆相関することが示された。したがって、**gap** 結合透過性が高い、あるいは **gap** 結合の最小内径より小さい分子径を有し単純拡散透過性が低い **MDR1** あるいは **BCRP** 基質薬物の胎児移行は、**gap** 結合を介した細胞膜を迂回した輸送により、**MDR1** あるいは **BCRP** の影響が弱まることが予想される。

## 第四章 結論

血液脳関門とヒト胎盤関門では、MDR1 と BCRP は循環血流に接するように発現するため、両者ともに基質薬物を循環血中に汲み出すことで胎児や脳への薬物分布制御に寄与している。一方、齧歯類胎盤は MDR1 と BCRP は SynT-I と SynT-II の間に発現し、ヒト胎盤や脳とは異なり MDR1 と BCRP は循環血流に接していない。本研究では、齧歯類胎盤における MDR1 と BCRP の局在の違いが組織分布抑制活性に与える影響を定量的に評価することを目的に、マウス胎盤関門と血液脳関門での MDR1 および BCRP の発現分子数と組織薬物分布制御における MDR1 と BCRP の寄与を定量的に比較した。

第二章では、マウス胎盤迷路部細胞膜画分における MDR1 および BCRP 発現量を LC-MS/MS を用いて定量し、マウス脳毛細血管内皮細胞での MDR1 および BCRP 発現量と比較した。その結果、胎盤関門の SynT-II apical membrane における推定 MDR1 発現量は血液脳関門における脳毛細血管内皮細胞の約 1/4~1/3 程度であった。BCRP 発現量は 3 倍~同程度であった。つまり、血液脳関門に比べて胎盤関門における MDR1 発現量は少ない一方、BCRP 発現量は同程度か妊娠日数によっては胎盤関門の方が血液脳関門よりも一過的に高いことが明らかとなった。

第三章では、MDR1 基質として paclitaxel と digoxin、BCRP 基質として genistein と dantrolene を用いて、野生型および Mdr1a/b 欠損あるいは Bcrp 欠損妊娠マウスにおける  $K_{p,fp}$  と  $K_{p,brain}$  を測定し、 $K_p$  ratio を算出した。 $K_p$  ratio から各関門での MDR1 あるいは BCRP の寄与を求め、第二章で定量した発現分子数を用いて MDR1 あるいは BCRP の胎盤関門の血液脳関門に対する寄与比を求めた。MDR1 基質である paclitaxel は胎盤関門と血液脳関門で組織薬物分布抑制に



における MDR1 の寄与に差がなかった。一方で、MDR1 基質である digoxin と BCRP 基質である genistein、dantrolene では胎盤関門における MDR1 あるいは BCRP の寄与は血液脳関門での寄与に比べて低かった。マウス胎盤関門の経胎盤輸送速度論モデルに基づくと、胎盤関門における MDR1 と BCRP の寄与は、connexin26 による gap 結合を介した輸送クリアランス ( $P_{GJ}$ ) の単純拡散の透過クリアランス ( $P_{diff}$ ) に対する比と逆相関する。Connexin26 による gap 結合の最小内径は 1.4 nm であり (Maeda et al. 2009)、本章で用いた paclitaxel 以外の digoxin、genistein、および dantrolene における最小投影径は 1.4nm 未満であるため、connexin26 による gap 結合を十分に透過できるサイズである。脂質二重膜の透過性は脂溶性が高い方が優れている。Paclitaxel は digoxin、genistein、および dantrolene よりも脂溶性が高いため、digoxin、genistein、dantrolene の  $P_{diff}$  はより小さい値をとることが想定できる。そのため、digoxin、genistein、および dantrolene については  $P_{GJ}/P_{diff}$  が大きくなり、MDR1 や BCRP による寄与が明確に示されなかったと考える。本章から、connexin26 による gap 結合を透過できる分子径を有し単純拡散速度が遅い MDR1 あるいは BCRP 基質は、gap 結合による迂回輸送の影響で、マウス胎盤関門における MDR1 または BCRP の寄与が小さくなることが明らかとなった。

ヒトでの機能解析は困難であるため、MDR1 や BCRP の基質となる薬物の胎児移行性は動物種、特に齧歯類を用いた非臨床試験にて評価される。これまで、齧歯類からヒトに MDR1 や BCRP の基質となる薬物の胎児移行性を外挿する際には、SynT 層の構造種差を踏まえずに考えられてきたが、gap 結合による透過性が大きく、分子径が 1.4nm 未満で単純拡散速度が遅い基質ではヒトでの MDR1 や BCRP の寄与が低く見積もられる可能性がある。本研究結果から、connexin26 による影響を加味した経胎盤輸送速度論モデルを用いることができ

れば、より確度高くヒトでの MDR1 と BCRP の機能を推定できると考える。

近年、初産年齢の高齢化に伴って悪性腫瘍や自己免疫疾患、生活習慣病といった疾患により薬物治療が必要な妊婦は増加してきている。そのため、母体の薬物治療による薬物の胎児移行性を定量的に評価し、児の安全性を高めることは急務である。本研究は、MDR1 と BCRP の胎児薬物分布制御における齧歯類とヒトとの種差を克服し、ヒトでの薬物の胎児移行性を定量的に評価するための端緒となる研究であり、安全で有効な母体薬物治療に貢献するものである。

## 実験の部

### 試薬

Paclitaxel (Taxol®) は Bristol-Myers Squibb Canada (Montreal, PQ, Canada) より購入した。Docetaxel (ドセタキセル点滴静注 20mg/mL 「ニプロ」) はニプロ株式会社 (Osaka, Japan) より購入した。Dantrolene sodium salt hemiheptahydrate (dantrolene)、digitoxin、および nitrofurazone は和光純薬工業株式会社で購入した。Daizein、digoxin、および genistein は東京化成工業株式会社 (Tokyo, Japan) より購入した。その他全ての試薬については特に断りがない限り特級のものを使用した。

### 実験動物

Mdr1a/1b 欠損および Bcrp 欠損 FVB マウスはタコニック社より購入した。野生型 FVB マウスは日本クレアにて購入した。マウスは 12 時間ごとに管理し、自由飲水・給餌下で飼育した。野生型、Mdr1a/1b 欠損型雌性マウスはそれぞれ同一表現系の雄性マウスと交配し、膣栓が確認できた日を GD 0.5 とした。全ての動物実験は、「薬物および生体内物質の血液組織関門透過機構」というタイトルで慶應義塾大学の実験動物委員会の承認 (承認番号 12040- (5) (6) (7) (8) (9)) を受け、ガイドラインに遵守した上で行っている。

### ヒト胎盤 MVM 画分の精製

満期ヒト胎盤組織は「胎盤を介した母体胎児間物質透過メカニズムに関する研究」というタイトルで慶應義塾大学薬学部 (承認番号: 171222-2、180427-4、200312-3、201005-1) および慶應義塾大学附属病院 (承認番号:20110250) の倫理委員会で承認を得ており、インフォームドコンセントを得たのち入手した。ヒト胎盤は帝王切開既往または骨盤位分娩のため帝王切開が必要な妊婦より採取した。ヒト胎盤 MVM 画分は既報に則り (Takahashi et al. 2017)、マグネシウム沈降法によって精製した。

本研究で用いたヒト胎盤 MVM 画分中の MVM マーカーであるアルカリフォスファターゼ活性は胎盤絨毛組織ホモジネートの  $11.4 \pm 0.23$  倍 ( $n = 4$ ) であった。

### LC-MS/MS を用いた標的タンパク質の定量分析

輸送体タンパク質の発現量は、既報の通り目的の輸送体タンパク質から生成した特異的 (ST) ペプチドの発現分子数を LC-MS/MS により定量することにより測定した(Nishimura et al. 2019; Uchida et al. 2013b)。細胞膜画分 (100 µg protein) を還元してアルキル化し、アルキル化されたタンパク質は、メタノールとクロロホルムで沈殿させ精製した。沈殿したタンパク質を尿素に溶解し、リシルエンドペプチダーゼと ProteaseMAX 界面活性剤 (Promega, Madison, WI, USA)、N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone 処理したトリプシン (Promega) で処理しペプチド断片化した。得られたペプチドサンプルに IS ペプチドを添加し、ギ酸で酸性化した。

LC-MS/MS システムは、高速液体クロマトグラフィー装置とポジティブイオン化モードで動作する ESI 化トリプル四重極質量分析計 (LCMS-8050 ; 島津製作所、日本、京都) を使用した。測定試料は、40 °C の LC システム上の XBridge BEH130 C18 カラム (1 mm I.D. × 100 mm, 3.5µm, Waters, Milford, MA) に注入し、0.1%ギ酸含有アセトニトリルの線形グラジエントで溶出した。溶出したペプチドを LabSolutions ソフトウェア (島津製作所) を用いた MRM モニタリング (SRM) により定量化した。1 ペプチド当たり 10 msec の dwell 時間で遷移し、S/N 比が 3 以上のピークを陽性とした。試料中のペプチド量は、まず Q3 ごとに、陽性ピークのピーク面積比 (ST/IS) と既知濃度の合成ペプチドで得た検量線を用いて求め、その後、異なる 3 つの Q3 陽性ピークの平均値で表した。

## 妊娠マウスへの薬物投与実験

### Paclitaxel の 48 時間持続投与実験

Mdr1a/b 欠損または野生型妊娠マウスに、浸透圧ポンプ (Alzet model 1003D: Durect, Cupertino, CA, USA) を用いて paclitaxel を 1.0µL/h の送液量で GD13.5 と 15.5 から 48 時間連続的に投与した。浸透圧ポンプに超純水で 3.51 mM に希釈した paclitaxel を充填し、イソフルランで深麻酔したマウスの背部皮下組織に移植した。投与開始 24 および 36 時間後に尾静脈から母体血を採取し、母体血漿中 paclitaxel 濃度の時間推移を確認した。投与開始後 48 時間に、母体を開腹し胎児を摘出して断頭し、ヘパリン化ヘマトクリット毛細管で胎児血液を採取した。同時に、母体の血液を左頸静脈から採取し、その後、絶命後に母体の大脳を摘

出して重量を測定した。

#### digoxin の 72 時間持続投与実験

Mdr1a/b 欠損または野生型妊娠マウスに、浸透圧ポンプを用いて digoxin を 1.0 $\mu$ L/h の送液量で GD12.5 と 14.5 から 72 時間連続的に投与した。浸透圧ポンプに 80% PEG400/DMSO に溶解した digoxin (230  $\mu$ M) を充填し、イソフルランで深麻酔したマウスの背部皮下組織に移植した。母体血漿中 digoxin 濃度の時間推移を測定するため、投与 48 時間後に尾静脈から母体の血液を採取した。投与開始後 72 時間に、母体を開腹し胎児を摘出して断頭し、ヘパリン化ヘマトクリット毛細管で胎児血液を採取した。同時に、母体の血液を左頸静脈から採取し、その後、絶命後に母体の大脳を摘出して重量を測定した。

#### Dantrolene の 24 時間持続投与実験

Bcrp 欠損または野生型妊娠マウスに、浸透圧ポンプ (Alzet model 2001D: Durect, Cupertino, CA, USA) を用いて dantrolene を 8.0 $\mu$ L/h の送液量で GD16.5 から 72 時間連続的に投与した。浸透圧ポンプにプロピレングリコールに溶解した dantrolene (3mg/mL) を充填し、ポリエチレンチューブ PE10 (日本 BD、Tokyo、japan) を装着した。イソフルランで深麻酔したマウスの頸静脈よりカニューレーションし、浸透圧ポンプは背部皮下組織に移植した。母体血漿中 dantrolene 濃度の時間推移を測定するため、投与 6 と 18 時間後に尾静脈から母体の血液を採取した。投与開始後 24 時間に、母体を開腹し胎児を摘出して断頭し、ヘパリン化ヘマトクリット毛細管で胎児血液を採取した。同時に、母体の血液を左頸静脈から採取した。

#### Dantrolene の 2 時間持続投与実験

Bcrp 欠損または野生型妊娠マウスに、シリンジポンプ (Kd Scientific、USA) を用いて dantrolene を 0.07mL/h の送液量で GD15.5 に 2 時間持続投与した。Dantrolene は DMSO で 2mg/mL となるように溶解し、0.2mg/ml となるように 50% PEG400/PBS で希釈したのち、1 mL シリンジに充填した。シリンジにポリエチレンチューブ PE10 を装着し、イソフルランで深麻酔したマウスの大腿静脈より

チューブをカニューレションした。母体血漿中 dantrolene 濃度の時間推移を測定するため、投与 30、60、および 90 分後に頸静脈から母体の血液を 50 $\mu$ L ずつ採取した。投与開始後 2 時間に、母体を開腹し胎児を摘出して断頭し、EDTA-2K 化ヘマトクリット毛細管で胎児血液を採取した。同時に、母体の血液を頸静脈から採取し、その後、絶命後に母体の大脳を摘出して重量を測定した。

#### genistein の 2 時間持続投与実験

Bcrp 欠損または野生型妊娠マウスに、シリンジポンプを用いて genistein を 5nmol/h の送液量で GD15.5 と 17.5 に 2 時間持続投与した。Genistein は DMSO で 12.5mM となるように溶解し、1.25mM となるように 2mM 水酸化ナトリウム/生理食塩水で希釈したのち、1 mL シリンジに充填した。投与および試料採取の操作は Dantrolene の投与実験で記した通りに行った。

#### 分配係数測定実験

Dantrolene および genistein の pH 7.4 における分配係数を、フラスコ振とう法によって測定した(OECD/OCDE 1995)。

超純水と 1-オクタノールを同一容器に入れて 24 時間穏やかに振とうした後、十分な時間静置して 1-オクタノール飽和水 (水相) と水飽和 1-オクタノール (油相) を分取した。水相は、リン酸二水素カリウムと水酸化ナトリウムを用いて、pH 7.4 の 50 mM リン酸塩緩衝液とした。Dantrolene および genistein はそれぞれ 5 mM および 50 mM となるように DMSO で溶解し、それぞれの溶液を 22.2  $\mu$ M となるように油相で希釈した。

水相と油相の体積比の異なる(1)水相：油相=1：1、(2)水相：油相=1：2、(3)水相：油相=2：1 の三条件下で各 2 回測定を行った。30 ml ねじ口遠沈管 (アズワン, Osaka, Japan) に、各条件の体積比に合わせて水相および 22.2  $\mu$ M 薬物溶解油相を入れ、20 rpm で 5 分間振とうした後、1000 g で 20 分間遠心分離を行い、二相が完全に分離させ、油相、水相から等量分取した。

#### 血漿中および組織中の薬物濃度の測定

血液を 15,000 rpm、4°C で 20 分間遠心分離し、血漿を得た。大脳を水 (paclitaxel、

dantrolene、genistein 投与群) または 10 mM 酢酸アンモニウム (digoxin 投与群) でホモジナイズし、20% 大脳ホモジネートを得た。

paclitaxel の定量には、血漿および脳ホモジネートを 5 容量の tert-ブチルメチルエーテルで希釈し、IS を添加した。digoxin は、血漿および脳ホモジネートを 0.1% ギ酸含有アセトニトリルで 2 倍希釈し、IS を添加した。Dantrolene および genistein は血漿および脳ホモジネートを IS が添加された acetonitrile でそれぞれ 7 倍と 8 倍に希釈した。ボルテックス後、15,000 g、4°C で 10 分間遠心分離した。上清を真空遠心機で蒸発させた。Paclitaxel と digoxin では、残渣を 50% (paclitaxel、dantrolene、genistein) または 20% (digoxin) 移動相 B で再構成し、15,000 g、4°C で 1 分間遠心分離した。血漿中および大脳ホモジネート中の薬物濃度は LC-MS/MS 条件を用いて測定した。検量線を用いて、IS とのピーク面積比から分析対象物の濃度を決定し、定量下限は paclitaxel で 0.2 ng/mL、digoxin で 0.5 ng/mL、dantrolene で 0.5 ng/mL、genistein で 0.01  $\mu$ M となった。

## Paclitaxel と digoxin の非結合型分率の測定

非結合型分率は、Rapid Equilibrium Dialysis Device (Red-device) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いた平衡透析により測定した。Paclitaxel と  $[^3\text{H}(\text{G})]$  digoxin ( $[^3\text{H}]$  digoxin, 39.8 Ci/mmol; PerkinElmer, Boston, MA, USA) をそれぞれ 26 と 13nM に最終濃度になるよう母体または胎児血漿に添加した。薬物添加した血漿 (100  $\mu\text{L}$ ) を red-device の sample chamber に添加し、buffer chamber に 350  $\mu\text{L}$  のリン酸緩衝生理食塩水を満たした。血漿が充填された red-device をシールテープで覆い、37°C、250rpm の振盪機で 12 時間インキュベートした。その後、両 chamber から同量採取し、それぞれ LC-MS/MS または液体シンチレーション計数法で paclitaxel 濃度または  $[^3\text{H}]$  digoxin の放射能を測定した。母体および胎児血漿中の非結合型画分 ( $f_{u,\text{mp}}$  および  $f_{u,\text{fp}}$ ) は、PBS と血漿濃度 (放射能) の比として算出した。母体および胎児血漿中のアルブミン濃度は、LBIS マウスアルブミン ELISA キット (富士フイルム和光シバヤギ、日本、渋川) を用いて、添付のプロトコルにしたがって行った。

## データ解析

統計解析は、対応のない両側 Student's t-test を用いて行い、 $p < 0.05$  の値を統計的に有意な差の基準として採用した。

すべてのデータは、特に断りのない限り平均値  $\pm$  S.E.M. で表した。S.E.M. は、複数の測定変数がある場合、誤差伝播の法則に従って計算した。



## 引用文献

- Adachi, Yasuhisa, Hiroshi Suzuki, and Yuichi Sugiyama. 2001. "Comparative Studies on in Vitro Methods for Evaluating in Vivo Function of MDR1 P-Glycoprotein." *Pharmaceutical Research* 18 (12) . doi: 10.1023/A:1013358126640.
- Akashi, Tomoya, Tomohiro Nishimura, Yoshiya Takaki, Masaya Takahashi, Bo Chul Shin, Masatoshi Tomi, and Emi Nakashima. 2016. "Layer II of Placental Syncytiotrophoblasts Expresses MDR1 and BCRP at the Apical Membrane in Rodents." *Reproductive Toxicology* 65:375–81. doi: 10.1016/J.REPROTOX.2016.09.002.
- Aleksunes, Lauren M., Yue Cui, and Curtis D. Klaassen. 2008. "Prominent Expression of Xenobiotic Efflux Transporters in Mouse Extraembryonic Fetal Membranes Compared with Placenta." *Drug Metabolism and Disposition* 36 (9) :1960–70. doi: 10.1124/dmd.108.021337.
- Amano, Takayuki, Tatsuki Fukami, Takuo Ogiso, Daisuke Hirose, Jeffrey P. Jones, Tsuyoshi Taniguchi, and Miki Nakajima. 2018. "Identification of Enzymes Responsible for Dantrolene Metabolism in the Human Liver: A Clue to Uncover the Cause of Liver Injury." *Biochemical Pharmacology* 151. doi: 10.1016/j.bcp.2018.03.002.
- Anoshchenko, Olena, Bhagwat Prasad, Naveen K. Neradugomma, Joanne Wang, Qingcheng Mao, and Jashvant D. Unadkat. 2020. "Gestational Age-Dependent Abundance of Human Placental Transporters as Determined by Quantitative Targeted Proteomics." *Drug Metabolism and Disposition* 48 (9) :735–41. doi: 10.1124/DMD.120.000067.
- Aronica, Eleonora, Jan A. Gorter, Sandra Redeker, Erwin A. van Vliet, Marja Ramkema, George L. Scheffer, Rik J. Scheper, Paul van der Valk, Sieger Leenstra, Johannes C. Baayen, Wim G. M. Spliet, and Dirk Troost. 2005. "Localization of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) in Microvessel Endothelium of Human Control and Epileptic Brain." *Epilepsia* 46 (6) . doi: 10.1111/j.1528-1167.2005.66604.x.
- van Asperen, Judith, Ulrich Mayer, Olaf van Tellingen, and Jos H. Beijnen. 1997. "The Functional Role of P-Glycoprotein in the Blood-Brain Barrier." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 86 (8) . doi: 10.1021/js9701364.
- Bardelmeijer, Heleen A., Ingrid A. M. Oomen, Michel J. X. Hillebrand, Jos H. Beijnen, Jan H. M. Schellens, and Olaf van Tellingen. 2003. "Metabolism of Paclitaxel in Mice." *Anti-Cancer Drugs* 14 (3) . doi: 10.1097/00001813-200303000-00003.
- Beaulieu, Édith, Michel Demeule, Lucian Ghitescu, and Richard Béliveau. 1997. "P-Glycoprotein Is Strongly Expressed in the Luminal Membranes of the Endothelium of Blood Vessels in the Brain." *Biochemical Journal* 326 (2) . doi: 10.1042/bj3260539.

- Benet, Leslie Z., Fabio Broccatelli, and Tudor I. Oprea. 2011. "BDDCS Applied to Over 900 Drugs." *The AAPS Journal* 13 (4) . doi: 10.1208/s12248-011-9290-9.
- Bevans, Carville G., Marianne Kordel, Seung K. Rhee, and Andrew L. Harris. 1998. "Isoform Composition of Connexin Channels Determines Selectivity among Second Messengers and Uncharged Molecules." *Journal of Biological Chemistry* 273 (5) . doi: 10.1074/jbc.273.5.2808.
- Blazquez, Alba G., Oscar Briz, Marta R. Romero, Ruben Rosales, Maria J. Monte, Javier Vaquero, Rocio I. R. Macias, Doris Cassio, and Jose J. G. Marin. 2012. "Characterization of the Role of ABCG2 as a Bile Acid Transporter in Liver and Placenta." *Molecular Pharmacology* 81 (2) . doi: 10.1124/mol.111.075143.
- Breinholt, Vibeke M., Salka E. Rasmussen, Kim Brøsen, and Thomas H. Friedberg. 2003. "In Vitro Metabolism of Genistein and Tangeretin by Human and Murine Cytochrome P450s." *Pharmacology and Toxicology* 93 (1) . doi: 10.1034/j.1600-0773.2003.930102.x.
- Burckhardt, Birgitta C., Maja Henjakovic, Yohannes Hagos, and Gerhard Burckhardt. 2016. "Counter-Flow Suggests Transport of Dantrolene and 5-OH Dantrolene by the Organic Anion Transporters 2 (OAT2) and 3 (OAT3) ." *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 468 (11–12) . doi: 10.1007/s00424-016-1894-6.
- Capomacchia, A. C., J. J. Vallner, and L. Boone. 1978. "Aggregation of Dantrolene to Human Serum Albumin." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 67 (7) . doi: 10.1002/jps.2600670753.
- Chen, Hao, Alan G. Fantel, and Mont R. Juchau. 2000. "Catalysis of the 4-Hydroxylation of Retinoic Acids by CYP3A7 in Human Fetal Hepatic Tissues." *Drug Metabolism and Disposition* 28 (9) .
- Coan, P. M., E. Angiolini, I. Sandovici, G. J. Burton, M. Constância, and A. L. Fowden. 2008. "Adaptations in Placental Nutrient Transfer Capacity to Meet Fetal Growth Demands Depend on Placental Size in Mice." *Journal of Physiology* 586 (18) . doi: 10.1113/jphysiol.2008.156133.
- Coan, P. M., A. C. Ferguson-Smith, and G. J. Burton. 2005. "Ultrastructural Changes in the Interhaemal Membrane and Junctional Zone of the Murine Choriollantoic Placenta across Gestation." *Journal of Anatomy* 207 (6) . doi: 10.1111/j.1469-7580.2005.00488.x.
- Coles, Lisa D., Insong J. Lee, Hazem E. Hassan, and Natalie D. Eddington. 2009. "Distribution of Saquinavir, Methadone, and Buprenorphine in Maternal Brain, Placenta, and Fetus during Two Different Gestational Stages of Pregnancy in Mice." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 98 (8) . doi: 10.1002/jps.21644.
- Cottreau, Carrie M., Inna Dashevsky, Susan E. Andrade, De Kun Li, Larissa Nekhlyudov, Marsha A. Raebel, Debra P. Ritzwoller, Ann H. Partridge, Pamala A. Pawloski, and

- Sengwee Toh. 2019. "Pregnancy-Associated Cancer: A U.S. Population-Based Study." *Journal of Women's Health* 28 (2) :250–57. doi: 10.1089/jwh.2018.6962.
- Dilworth, M. R., and C. P. Sibley. 2013. "Review: Transport across the Placenta of Mice and Women." in *Placenta*. Vol. 34.
- Durmus, Selvi, Jeroen J. M. A. Hendriks, and Alfred H. Schinkel. 2015. "Apical ABC Transporters and Cancer Chemotherapeutic Drug Disposition." in *Advances in Cancer Research*. Vol. 125.
- Enders, Allen C., and Thomas N. Blankenship. 1999. "Comparative Placental Structure." *Advanced Drug Delivery Reviews* 38 (1) . doi: 10.1016/S0169-409X (99) 00003-4.
- Enokizono, Junichi, Hiroyuki Kusuhara, Atsushi Ose, Alfred H. Schinkel, and Yuichi Sugiyama. 2008. "Quantitative Investigation of the Role of Breast Cancer Resistance Protein (Bcrp/Abcg2) in Limiting Brain and Testis Penetration of Xenobiotic Compounds." *Drug Metabolism and Disposition* 36 (6) :995–1002. doi: 10.1124/dmd.107.019257.
- Enokizono, Junichi, Hiroyuki Kusuhara, and Yuichi Sugiyama. 2007. "Effect of Breast Cancer Resistance Protein (Bcrp/Abcg2) on the Disposition of Phytoestrogens." *Molecular Pharmacology* 72 (4) :967–75. doi: 10.1124/MOL.107.034751.
- Evered, D. C. 1972. "The Binding of Digoxin by the Serum Proteins." *European Journal of Pharmacology* 18 (2) . doi: 10.1016/0014-2999 (72) 90247-6.
- Gabriel, Heinz Dieter, Dirk Jung, Christoph Bützler, Achim Temme, Otto Traub, Elke Winterhager, and Klaus Willecke. 1998. "Transplacental Uptake of Glucose Is Decreased in Embryonic Lethal Connexin26-Deficient Mice." *Journal of Cell Biology* 140 (6) . doi: 10.1083/jcb.140.6.1453.
- Gil, Sophie, R. Saura, F. Forestier, and R. Farinotti. 2005. "P-Glycoprotein Expression of the Human Placenta during Pregnancy." *Placenta* 26 (2–3) . doi: 10.1016/j.placenta.2004.05.013.
- de Haan, Jorine, Magali Verheecke, Kristel van Calsteren, Ben van Calster, Roman G. Shmakov, Mina Mhallem Gziri, Michael J. Halaska, Robert Fruscio, Christianne A. R. Lok, Ingrid A. Boere, Paolo Zola, Petronella B. Ottevanger, Christianne J. M. de Groot, Fedro A. Peccatori, Karina Dahl Steffensen, Elyce H. Cardonick, Evgeniya Polushkina, Lukas Rob, Lorenzo Ceppi, Gennady T. Sukhikh, Sileny N. Han, and Frédéric Amant. 2018. "Oncological Management and Obstetric and Neonatal Outcomes for Women Diagnosed with Cancer during Pregnancy: A 20-Year International Cohort Study of 1170 Patients." *The Lancet Oncology* 19 (3) :337–46. doi: 10.1016/S1470-2045 (18) 30059-7.
- Hammarlund-Udenaes, Margareta, Markus Fridén, Stina Syvänen, and Anubha Gupta. 2008.

- “On the Rate and Extent of Drug Delivery to the Brain.” *Pharmaceutical Research* 25 (8) .
- Han, Lyrialle W., Chunying Gao, and Qingcheng Mao. 2018. “An Update on Expression and Function of P-Gp/ABCB1 and BCRP/ABCG2 in the Placenta and Fetus.” *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology* 14 (8) :817–29.
- Hart, Steven N., Yue Cui, Curtis D. Klaassen, and Xiao Bo Zhong. 2009. “Three Patterns of Cytochrome P450 Gene Expression during Liver Maturation in Mice.” *Drug Metabolism and Disposition* 37 (1) . doi: 10.1124/dmd.108.023812.
- Jayyosi, Z., J. Villoutreix, J. M. Ziegler, A. M. Batt, F. de Maack, G. Siest, and P. E. Thomas. 1993. “Identification of Cytochrome P-450 Isozymes Involved in the Hydroxylation of Dantrolene by Rat Liver Microsomes.” *Drug Metabolism and Disposition* 21 (5) .
- Jensen, M. L., D. Foster, R. Upton, C. Grant, A. Martinez, and A. Somogyi. 2008. “Comparison of Cerebral Pharmacokinetics of Buprenorphine and Norbuprenorphine in an in Vivo Sheep Model.” [Http://Dx.Doi.Org/10.1080/00498250701251126](http://Dx.Doi.Org/10.1080/00498250701251126) 37 (4) :441–57. doi: 10.1080/00498250701251126.
- Jonker, Johan W., Marije Buitelaar, Els Wagenaar, Martin A. van der Valk, George L. Scheffer, Rik J. Scheper, Torsten Plösch, Folkert Kuipers, Ronald P. J. Oude Elferink, Hilde Rosing, Jos H. Beijnen, and Alfred H. Schinkel. 2002. “The Breast Cancer Resistance Protein Protects against a Major Chlorophyll-Derived Dietary Phototoxin and Protoporphyrin.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (24) :15649–54. doi: 10.1073/pnas.202607599.
- Kalabis, G. M., S. Petropoulos, W. Gibb, and S. G. Matthews. 2007. “Breast Cancer Resistance Protein (Bcrp1/Abcg2) in Mouse Placenta and Yolk Sac: Ontogeny and Its Regulation by Progesterone.” *Placenta* 28 (10) :1073–81. doi: 10.1016/j.placenta.2007.03.010.
- Kalabis, Grazyna M., Alice Kostaki, Marcus H. Andrews, Sophie Petropoulos, William Gibb, and Stephen G. Matthews. 2005a. “Multidrug Resistance Phosphoglycoprotein (ABCB1) in the Mouse Placenta: Fetal Protection.” *Biology of Reproduction* 73 (4) . doi: 10.1095/biolreprod.105.042242.
- Kalabis, Grazyna M., Alice Kostaki, Marcus H. Andrews, Sophie Petropoulos, William Gibb, and Stephen G. Matthews. 2005b. “Multidrug Resistance Phosphoglycoprotein (ABCB1) in the Mouse Placenta: Fetal Protection1.” *Biology of Reproduction* 73 (4) :591–97. doi: 10.1095/biolreprod.105.042242.
- Karlgren, Maria, Anna Vildhede, Ulf Norinder, Jacek R. Wisniewski, Emi Kimoto, Yurong Lai, Ulf Haglund, and Per Artursson. 2012. “Classification of Inhibitors of Hepatic Organic Anion Transporting Polypeptides (OATPs) : Influence of Protein Expression on Drug-Drug Interactions.” *Journal of Medicinal Chemistry* 55 (10) . doi: 10.1021/jm300212s.

- Kawahara, Masami, Atsushi Sakata, Toshiaki Miyashita, Ikumi Tamai, and Akira Tsuji. 1999. "Physiologically Based Pharmacokinetics of Digoxin in Mdr1a Knockout Mice." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 88 (12) . doi: 10.1021/js9901763.
- Kliman, Harvey J., Sarah B. Quaratella, Alessandra C. Setaro, Erin C. Siegman, Zarrin T. Subha, Reshef Tal, Kristin M. Milano, and Theodore L. Steck. 2018. "Pathway of Maternal Serotonin to the Human Embryo and Fetus." *Endocrinology* 159 (4) . doi: 10.1210/en.2017-03025.
- Kodaira, Hiroshi, Hiroyuki Kusuhara, Takuya Fujita, Junko Ushiki, Eiichi Fuse, and Yuichi Sugiyama. 2011. "Quantitative Evaluation of the Impact of Active Efflux by P-Glycoprotein and Breast Cancer Resistance Protein at the Blood-Brain Barrier on the Predictability of the Unbound Concentrations of Drugs in the Brain Using Cerebrospinal Fluid Concentration as a Surrogate." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 339 (3) . doi: 10.1124/jpet.111.180398.
- Kodaira, Hiroshi, Hiroyuki Kusuhara, Junko Ushiki, Eiichi Fuse, and Yuichi Sugiyama. 2010. "Kinetic Analysis of the Cooperation of P-Glycoprotein (P-Gp/Abcb1) and Breast Cancer Resistance Protein (Bcrp/Abcg2) in Limiting the Brain and Testis Penetration of Erlotinib, Flavopiridol, and Mitoxantrone." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 333 (3) . doi: 10.1124/jpet.109.162321.
- Kondo, Chihiro, Hiroshi Suzuki, Masaya Itoda, Shogo Ozawa, Jun Ichi Sawada, Daisuke Kobayashi, Ichiro Ieiri, Kazunori Mine, Kenji Ohtsubo, and Yuichi Sugiyama. 2004. "Functional Analysis of SNPs Variants of BCRP/ABCG2." *Pharmaceutical Research* 21 (10) . doi: 10.1023/B:PHAM.0000045245.21637.d4.
- Kulling, S. E., D. M. Honig, and M. Metzler. 2001. "Oxidative Metabolism of the Soy Isoflavones Daidzein and Genistein in Humans in Vitro and in Vivo." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (6) . doi: 10.1021/jf0012695.
- Kumar, G. N., U. K. Walle, K. N. Bhalla, and T. Walle. 1993. "Binding of Taxol to Human Plasma, Albumin and Alpha 1-Acid Glycoprotein." *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology* 80 (3) :337-44.
- Lagas, Jurjen S., Maria L. Vlaming, Olaf Vantellingen, Els Wagenaar, Robert S. Jansen, Hilde Rosing, Jos H. Beijnen, and Alfred H. Schinkel. 2006. "Multidrug Resistance Protein 2 Is an Important Determinant of Paclitaxel Pharmacokinetics." doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1352.
- Lankas, George R., L. David Wise, Mark E. Cartwright, Todd Pippert, and Diane R. Umbenhauer. 1998. "Placental P-Glycoprotein Deficiency Enhances Susceptibility to Chemically Induced Birth Defects in Mice." *Reproductive Toxicology* 12 (4) :457-63. doi: 10.1016/S0890-6238 (98) 00027-6.

- Lee, Young Joo, Hiroyuki Kusunohara, Johan W. Jonker, Alfred H. Schinkel, and Yuichi Sugiyama. 2005. "Investigation of Efflux Transport of Dehydroepiandrosterone Sulfate and Mitoxantrone at the Mouse Blood-Brain Barrier: A Minor Role of Breast Cancer Resistance Protein." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 312 (1) . doi: 10.1124/jpet.104.073320.
- Li, Guo Fu, Guo Yu, Yanfei Li, Yi Zheng, Qing Shan Zheng, and Hartmut Derendorf. 2018. "Quantitative Estimation of Plasma Free Drug Fraction in Patients With Varying Degrees of Hepatic Impairment: A Methodological Evaluation." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 107 (7) . doi: 10.1016/j.xphs.2018.02.021.
- Liao, Michael Z., Chunying Gao, Laura M. Shireman, Brian Phillips, Linda J. Risler, Naveen K. Neradugomma, Prachi Choudhari, Bhagwat Prasad, Danny D. Shen, and Qingcheng Mao. 2017. "P-Gp/ABCB1 Exerts Differential Impacts on Brain and Fetal Exposure to Norbuprenorphine." *Pharmacological Research* 119:61–71. doi: 10.1016/j.phrs.2017.01.018.
- Liu, Houfu, Liang Huang, Yi Li, Tingting Fu, Xueying Sun, Yan Yan Zhang, Ruina Gao, Qingfang Chen, Wandong Zhang, Jasminder Sahi, Scott Summerfield, and Kelly Dong. 2017. "Correlation between Membrane Protein Expression Levels and Transcellular Transport Activity for Breast Cancer Resistance Protein." *Drug Metabolism and Disposition* 45 (5) . doi: 10.1124/dmd.116.074245.
- Maeda, Shoji, So Nakagawa, Michihiro Suga, Eiki Yamashita, Atsunori Oshima, Yoshinori Fujiyoshi, and Tomitake Tsukihara. 2009. "Structure of the Connexin 26 Gap Junction Channel at 3.5 Å Resolution." *Nature* 458 (7238) . doi: 10.1038/nature07869.
- Mathias, Anita A., Jane Hitti, and Jashvant D. Unadkat. 2005. "P-Glycoprotein and Breast Cancer Resistance Protein Expression in Human Placentae of Various Gestational Ages." *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 289 (4 58-4) . doi: 10.1152/ajpregu.00173.2005.
- Meyer Zu Schwabedissen, Henriette E., Markus Grube, Annette Dreisbach, Gabriele Jedlitschky, Konrad Meissner, Knud Linnemann, Christoph Fusch, Christoph A. Ritter, Uwe Völker, and Heyo K. Kroemer. 2006. "Epidermal Growth Factor-Mediated Activation of the MAP Kinase Cascade Results in Altered Expression and Function of ABCG2 (BCRP) ." *Drug Metabolism and Disposition* 34 (4) :524–33. doi: 10.1124/dmd.105.007591.
- Murray, Stephen A., Judith L. Morgan, Coleen Kane, Yashoda Sharma, Caleb S. Heffner, Jeffrey Lake, and Leah Rae Donahue. 2010. "Mouse Gestation Length Is Genetically Determined." *PLoS ONE* 5 (8) :e12418. doi: 10.1371/journal.pone.0012418.
- Nader, Ahmed M., and David R. Foster. 2014. "Suitability of Digoxin as a P-Glycoprotein

- Probe: Implications of Other Transporters on Sensitivity and Specificity.” *Journal of Clinical Pharmacology* 54 (1) .
- Nguyen, Hang, Shuzhong Zhang, and Marilyn E. Morris. 2003. “Effect of Flavonoids on MRP1-Mediated Transport in Panc-1 Cells.” *Journal of Pharmaceutical Sciences* 92 (2) . doi: 10.1002/jps.10283.
- Nishimura, Tomohiro, Yuichiro Sano, Yu Takahashi, Saki Noguchi, Yasuo Uchida, Akinori Takagi, Takahiro Tanaka, Satomi Katakura, Emi Nakashima, Masanori Tachikawa, Tetsuo Maruyama, Tetsuya Terasaki, and Masatoshi Tomi. 2019. “Quantification of ENT1 and ENT2 Proteins at the Placental Barrier and Contribution of These Transporters to Ribavirin Uptake.” *Journal of Pharmaceutical Sciences* 108 (12) :3917–22. doi: 10.1016/j.xphs.2019.09.005.
- OECD/OCDE. 1995. *Test No. 107: Partition Coefficient (n-Octanol/Water) : Shake Flask Method*. Vol. 107.
- Petropoulos, Sophie, Grazyna M. Kalabis, William Gibb, and Stephen G. Matthews. 2007. “Functional Changes of Mouse Placental Multidrug Resistance Phosphoglycoprotein (ABCB1) with Advancing Gestation and Regulation by Progesterone.” *Reproductive Sciences* 14 (4) :321–28. doi: 10.1177/1933719107303856.
- Raub, Thomas J. 2006. “P-Glycoprotein Recognition of Substrates and Circumvention through Rational Drug Design.” *Molecular Pharmaceutics* 3 (1) .
- Rennie, Monique Y., Junwu Mu, Anum Rahman, Dawei Qu, Kathie J. Whiteley, John G. Sled, and S. Lee Adamson. 2014. “The Uteroplacental, Fetoplacental, and Yolk Sac Circulations in the Mouse.” in *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy*.
- Sadiq, Muhammad Waqas, Yasuo Uchida, Yutaro Hoshi, Masanori Tachikawa, Tetsuya Terasaki, and Margareta Hammarlund-Udenaes. 2015. “Validation of a P-Glycoprotein (P-Gp) Humanized Mouse Model by Integrating Selective Absolute Quantification of Human MDR1, Mouse Mdr1a and Mdr1b Protein Expressions with In Vivo Functional Analysis for Blood-Brain Barrier Transport.” *PLOS ONE* 10 (5) :e0118638. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0118638.
- Schinkel, Alfred H., Ulrich Mayer, Els Wagenaar, Carla A.A.M. Mol, Liesbeth van Deemter, Jaap J. M. Smit, Martin A. van der Valk, Arie C. Voordouw, Hergen Spits, Olaf van Tellingen, J. Mark J. M. Zijlmans, Willem E. Fibbe, and Piet Borst. 1997. “Normal Viability and Altered Pharmacokinetics in Mice Lacking Mdr1-Type (Drug-Transporting) P-Glycoproteins.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (8) :4028–33. doi: 10.1073/pnas.94.8.4028.
- Schinkel, Alfred H., Ulrich Mayer, Els Wagenaar, Carla A. A. M. Mol, Liesbeth van Deemter, Jaap J. M. Smit, Martin A. van der Valk, Arie C. Voordouw, Hergen Spits, Olaf van

- Tellingens, J. Mark J. M. Zijlmans, Willem E. Fibbe, and Piet Borst. 1997. "Normal Viability and Altered Pharmacokinetics in Mice Lacking Mdr1-Type (Drug-Transporting) P-Glycoproteins." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (8) :4028–33. doi: 10.1073/PNAS.94.8.4028.
- Schinkel, Alfred H., Els Wagenaar, Liesbeth van Deemter, Carla A. A. M. Mol, and Piet Borst. 1995. "Absence of the Mdr1a P-Glycoprotein in Mice Affects Tissue Distribution and Pharmacokinetics of Dexamethasone, Digoxin, and Cyclosporin A." *Journal of Clinical Investigation* 96 (4) . doi: 10.1172/JCI118214.
- Shin, Bo Chul, Takeshi Suzuki, Toshiyuki Matsuzaki, Shigeyasu Tanaka, Akio Kuraoka, Yosaburo Shibata, and Kuniaki Takata. 1996. "Immunolocalization of GLUT1 and Connexin 26 in the Rat Placenta." *Cell and Tissue Research* 285 (1) . doi: 10.1007/s004410050623.
- Shirasaka, Yoshiyuki, Toshiyasu Sakane, and Shinji Yamashita. 2008. "Effect of P-Glycoprotein Expression Levels on the Concentration-Dependent Permeability of Drugs to the Cell Membrane." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 97 (1) . doi: 10.1002/jps.21114.
- Sibley, C. P., P. M. Coan, A. C. Ferguson-Smith, W. Dean, J. Hughes, P. Smith, W. Reik, G. J. Burton, A. L. Fowden, and M. Constância. 2004. "Placental-Specific Insulin-like Growth Factor 2 (Igf2) Regulates the Diffusional Exchange Characteristics of the Mouse Placenta." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (21) :8204–8. doi: 10.1073/pnas.0402508101.
- Smit, Johan W., Maarten T. Huisman, Olaf van Tellingen, Hugh R. Wiltshire, and Alfred H. Schinkel. 1999. "Absence or Pharmacological Blocking of Placental P-Glycoprotein Profoundly Increases Fetal Drug Exposure." *Journal of Clinical Investigation* 104 (10) :1441–47. doi: 10.1172/JCI7963.
- Stensheim, Hanne, Bjørn Møller, Tini van Dijk, and Sophie D. Fosså. 2009. "Cause-Specific Survival for Women Diagnosed with Cancer during Pregnancy or Lactation: A Registry-Based Cohort Study." *Journal of Clinical Oncology* 27 (1) . doi: 10.1200/JCO.2008.17.4110.
- Suchyna, Thomas M., Johannes M. Nitsche, Mark Chilton, Andrew L. Harris, Richard D. Veenstra, and Bruce J. Nicholson. 1999. "Different Ionic Selectivities for Connexins 26 and 32 Produce Rectifying Gap Junction Channels." *Biophysical Journal* 77 (6) . doi: 10.1016/S0006-3495 (99) 77129-8.
- Sugiyama, Daisuke, Hiroyuki Kusuhara, Hirokazu Taniguchi, Shumpei Ishikawa, Yoshitane Nozaki, Hiroyuki Aburatani, and Yuichi Sugiyama. 2003. "Functional Characterization of Rat Brain-Specific Organic Anion Transporter (Oatp14) at the Blood-Brain Barrier:



- High Affinity Transporter for Thyroxine.” *Journal of Biological Chemistry* 278 (44) . doi: 10.1074/jbc.M306933200.
- Sun, M., J. Kingdom, D. Baczyk, S. J. Lye, S. G. Matthews, and W. Gibb. 2006. “Expression of the Multidrug Resistance P-Glycoprotein, (ABCB1 Glycoprotein) in the Human Placenta Decreases with Advancing Gestation.” *Placenta* 27 (6–7) :602–9. doi: 10.1016/j.placenta.2005.05.007.
- Supko, J. G., and L. Malspeis. 1995. “Plasma Pharmacokinetics of Genistein in Mice.” *International Journal of Oncology* 7 (4) . doi: 10.3892/ijo.7.4.847.
- Szilagyi, John T., Anna M. Vetrano, Jeffrey D. Laskin, and Lauren M. Aleksunes. 2017. “Localization of the Placental BCRP/ABCG2 Transporter to Lipid Rafts: Role for Cholesterol in Mediating Efflux Activity.” *Placenta* 55. doi: 10.1016/j.placenta.2017.04.006.
- Tachibana, Tatsuhiko, Satoshi Kitamura, Motohiro Kato, Tetsuya Mitsui, Yoshiyuki Shirasaka, Shinji Yamashita, and Yuichi Sugiyama. 2010. “Model Analysis of the Concentration-Dependent Permeability of p-Gp Substrates.” *Pharmaceutical Research* 27 (3) . doi: 10.1007/s11095-009-0026-9.
- Takahashi, Yu, Tomohiro Nishimura, Tetsuo Maruyama, Masatoshi Tomi, and Emi Nakashima. 2017. “Contributions of System A Subtypes to  $\alpha$ -Methylaminoisobutyric Acid Uptake by Placental Microvillous Membranes of Human and Rat.” *Amino Acids* 49 (4) . doi: 10.1007/s00726-017-2384-7.
- Takeuchi, Toshiyuki, Sumie Yoshitomi, Tomoaki Higuchi, Keiko Ikemoto, Shin Ichi Niwa, Takuya Ebihara, Miki Katoh, Tsuyoshi Yokoi, and Satoru Asahi. 2006. *Establishment and Characterization of the Transformants Stably-Expressing MDR1 Derived from Various Animal Species in LLC-PK1*. Vol. 23. Springer. doi: 10.1007/s11095-006-0285-7.
- Teasdale, F., and G. Jean-Jacques. 1988. “Intrauterine Growth Retardation: Morphometry of the Microvillous Membrane of the Human Placenta.” *Placenta* 9 (1) . doi: 10.1016/0143-4004 (88) 90072-0.
- Terao, M., M. Kurosaki, G. Saltini, S. Demontis, M. Marini, M. Salmona, and E. Garattini. 2000. “Cloning of the cDNAs Coding for Two Novel Molybdo-Flavoproteins Showing High Similarity with Aldehyde Oxidase and Xanthine Oxidoreductase.” *Journal of Biological Chemistry* 275 (39) . doi: 10.1074/jbc.M005355200.
- Tsinman, Oksana, Konstantin Tsinman, Na Sun, and Alex Avdeef. 2010. “Physicochemical Selectivity of the BBB Microenvironment Governing Passive Diffusion—Matching with a Porcine Brain Lipid Extract Artificial Membrane Permeability Model.” *Pharmaceutical Research* 28:228 (2) :337–63. doi: 10.1007/S11095-010-0280-X.
- Uchida, Yasuo, Sumio Ohtsuki, Junichi Kamiie, and Tetsuya Terasaki. 2011a. “Blood-Brain

- Barrier (BBB) Pharmacoproteomics: Reconstruction of in Vivo Brain Distribution of 11 P-Glycoprotein Substrates Based on the BBB Transporter Protein Concentration, in Vitro Intrinsic Transport Activity, and Unbound Fraction in Plasma and Brain.” *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 339 (2) :579–88. doi: 10.1124/jpet.111.184200.
- Uchida, Yasuo, Sumio Ohtsuki, Junichi Kamiie, and Tetsuya Terasaki. 2011b. “Blood-Brain Barrier (BBB) Pharmacoproteomics: Reconstruction of In Vivo Brain Distribution of 11 P-Glycoprotein Substrates Based on the BBB Transporter Protein Concentration, In Vitro Intrinsic Transport Activity, and Unbound Fraction in Plasma and Brain in Mice □ S.” doi: 10.1124/jpet.111.184200.
- Uchida, Yasuo, Masanori Tachikawa, Wataru Obuchi, Yutaro Hoshi, Yusuke Tomioka, Sumio Ohtsuki, and Tetsuya Terasaki. 2013. “A Study Protocol for Quantitative Targeted Absolute Proteomics (QTAP) by LC-MS/MS: Application for Inter-Strain Differences in Protein Expression Levels of Transporters, Receptors, Claudin-5, and Marker Proteins at the Blood-Brain Barrier in DdY, FVB, and C57BL/6J Mice.” *Fluids and Barriers of the CNS* 10 (1) . doi: 10.1186/2045-8118-10-21.
- Uchida, Yasuo, Kentaro Wakayama, Sumio Ohtsuki, Masato Chiba, Tomoyuki Ohe, Yasuyuki Ishii, and Tetsuya Terasaki. 2014. “Blood-Brain Barrier Pharmacoproteomics-Based Reconstruction of the in Vivo Brain Distribution of P-Glycoprotein Substrates in Cynomolgus Monkeys.” *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 350 (3) . doi: 10.1124/jpet.114.214536.
- Vallner, Joseph J. 1977. “Binding of Drugs by Albumin and Plasma Protein.” *Journal of Pharmaceutical Sciences* 66 (4) . doi: 10.1002/jps.2600660402.
- Virgintino, Daniela, David Robertson, Mariella Errede, Vincenzo Benaglio, Francesco Girolamo, Eugenio Maiorano, Luisa Roncali, and Mirella Bertossi. 2002. “Expression of P-Glycoprotein in Human Cerebral Cortex Microvessels.” *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 50 (12) . doi: 10.1177/002215540205001212.
- Wang, Honggang, Xiaohui Wu, Kelly Hudkins, Andrei Mikheev, Huixia Zhang, Anshul Gupta, Jashvant D. Unadkat, and Qingcheng Mao. 2006. “Expression of the Breast Cancer Resistance Protein (Bcrp1/Abcg2) in Tissues from Pregnant Mice: Effects of Pregnancy and Correlations with Nuclear Receptors.” *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 291 (6) . doi: 10.1152/ajpendo.00193.2006.
- Weber, Paul A., Hou Chien Chang, Kris E. Spaeth, Johannes M. Nitsche, and Bruce J. Nicholson. 2004. “The Permeability of Gap Junction Channels to Probes of Different Size Is Dependent on Connexin Composition and Permeant-Pore Affinities.” *Biophysical Journal* 87 (2) :958–73. doi: 10.1529/BIOPHYSJ.103.036350.

- Xiao, Guangqing, Cheryl Black, Gregg Hetu, Eric Sands, Joy Wang, Robin Caputo, Ellen Rohde, and Liang Shang L. Gan. 2012. "Cerebrospinal Fluid Can Be Used as a Surrogate to Assess Brain Exposures of Breast Cancer Resistance Protein and P-Glycoprotein Substrates." *Drug Metabolism and Disposition* 40 (4) . doi: 10.1124/dmd.111.043703.
- Yamasaki, Yuki, Kaoru Kobayashi, Fuka Okuya, Naoyo Kajitani, Kanako Kazuki, Satoshi Abe, Shoko Takehara, Shingo Ito, Seiryō Ogata, Tatsuki Uemura, Sumio Ohtsuki, Genki Minegishi, Hidetaka Akita, Kan Chiba, Mitsuo Oshimura, and Yasuhiro Kazuki. 2018. "Special Section-New Models in Drug Metabolism and Transport Characterization of P-Glycoprotein Humanized Mice Generated by Chromosome Engineering Technology: Its Utility for Prediction of Drug Distribution to the Brain in Humans s." *DRUG METABOLISM AND DISPOSITION Drug Metab Dispos* 46:1756–66. doi: 10.1124/dmd.118.081216.
- Zhang, Huixia, Xiaohui Wu, Honggang Wang, Andrei M. Mikheev, Qingcheng Mao, and Jashvant D. Unadkat. 2008. "Effect of Pregnancy on Cytochrome P450 3a and P-Glycoprotein Expression and Activity in the Mouse: Mechanisms, Tissue Specificity, and Time Course." *Molecular Pharmacology* 74 (3) :714–23. doi: 10.1124/mol.107.043851.
- Zhang, Huixia, Xiaohui Wu, Honggang Wang, Andrei M. Mikheev, Qingcheng Mao, and Jashvant D. Unadkat. n.d. "Effect of Pregnancy on Cytochrome P450 3a and P-Glycoprotein Expression and Activity in the Mouse: Mechanisms, Tissue Specificity, and Time Course." doi: 10.1124/mol.107.043851.
- Zhang, Yi, Honggang Wang, Jashvant D. Unadkat, and Qingcheng Mao. 2007. "Breast Cancer Resistance Protein 1 Limits Fetal Distribution of Nitrofurantoin in the Pregnant Mouse." *Drug Metabolism and Disposition* 35 (12) . doi: 10.1124/dmd.107.018044.
- Zhou, Lin, Suresh Babu Naraharisetti, Honggang Wang, Jashvant D. Unadkat, Mary F. Hebert, and Qingcheng Mao. 2008. "The Breast Cancer Resistance Protein (Bcrp1/Abcg2) Limits Fetal Distribution of Glyburide in the Pregnant Mouse: An Obstetric-Fetal Pharmacology Research Unit Network and University of Washington Specialized Center of Research Study." *Molecular Pharmacology* 73 (3) . doi: 10.1124/mol.107.041616.
- Zhu, Yan, Liang Zong, Ling Mei, and Hong Bo Zhao. 2015. "Connexin26 Gap Junction Mediates MiRNA Intercellular Genetic Communication in the Cochlea and Is Required for Inner Ear Development." *Scientific Reports* 5. doi: 10.1038/srep15647.

## 謝辞

本研究実施の機会を与えてくださり、本研究の遂行にあたり、終始、御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました慶應義塾大学薬学部薬剤学講座教授 登美斉俊先生に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、多大なる御指導、御助言を賜りました慶應義塾大学薬学部薬剤学講座准教授 西村友宏先生、ならびに同助教 野口幸希先生に深く感謝申し上げます。

本論文の審査にあたり、有益な御助言と論文の御高閲を賜りました慶應義塾大学薬学部薬効解析学講座教授 松元一明先生、ならびに慶應義塾大学薬学部薬物治療学講座教授 齋藤義正先生に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、ヒト胎盤試料入手への御協力並びに有益な御助言を賜りました慶應義塾大学医学部産婦人科学教室准教授 丸山哲夫先生、ならびに同大学院生 片倉慧美先生に謹んで感謝申し上げます。また、ヒト胎盤試料回収にあたり、御協力戴きました慶應義塾大学病院産科の医師・看護師の皆様、胎盤試料を御提供戴きました産婦の皆様感謝申し上げます。

社会人大学院生にご賛同くださり、業務の支えとなってくくださった上に、本研究の遂行にあたり有益な御助言を賜りました、金沢大学附属病院教授 崔吉道先生、ならびに同准教授 嶋田努先生に厚くお礼申し上げます。

本研究の遂行にご尽力いただき、積極的に実験に御協力いただきました、慶應義塾大学薬学部薬剤学講座 井上慧子氏、濱田リカ氏に心より感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、大変お世話になりました慶應義塾大学薬学部薬剤学講座秘書 河合あつみ氏に心より感謝申し上げます。

本研究に有益な御助言と御協力を賜り、共に過ごした博士課程の日々を支えて戴きました、慶應義塾大学薬学部薬剤学講座 稲垣舞氏並びに高橋優氏に心から感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、有益な御助言と御協力を戴きました慶應義塾大学薬学部薬剤学講座の皆様および卒業生の皆様に心より感謝申し上げます。

最後に、よき理解者として長きに亘る学生生活を精神的・経済的に支えてくれた家族に心から感謝します。