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

Title	胎児防御における関門遷移現象に基づく妊婦薬物療法の精緻化基盤
Sub Title	Medication for pregnant women based on 'barrier transition' behavior in feto-placental circulation
Author	登美, 斉俊(Tomi, Masatoshi) 西村, 友宏(Nishimura, Tomohiro)
Publisher	
Publication year	2017
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2016.)
JaLC DOI	
Abstract	妊娠進行に伴って, 胎盤関門において特にグルコーストランスポーター(GLUT1)やモノカルボン酸トランスポーター(MCT1)など, 胎児への栄養供給を担うトランスポーターのタンパク発現量は大きく変化する一方で, MDR1やBCRPの変動は大きくないことが明らかとなり, 胎盤関門の可塑的な変化をタンパク発現量として明確にすることができた。さらに, 胎盤関門と胎児血液脳関門の両方を機能制御しうる胎盤由来miRNAを見出すことができた。本研究成果を基盤として, 胎盤および胎児脳血管内皮細胞形成と協調的な機能制御に関わる臓器間ネットワークの解明につながることが期待できる。 We have clarified the developmental change in the placental transporters such as glucose transporter 1 (GLUT1) and monocarboxylate transporter 1 (MCT1), while the expressions of ABC transporters such as MDR1 and BCRP were unchanged during pregnancy. We also found a placenta-derived miRNA which may work for maturation of both placental and blood-brain barrier. These observations are helpful for examining the interorgan network in the fetoplacental circulation for establishing and managing barriers in the placenta and the brain.
Notes	研究種目 : 挑戦的萌芽研究 研究期間 : 2015 ~ 2016 課題番号 : 15K15007 研究分野 : 薬物動態学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_15K15007seika

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、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２９　年　　６　月　　７　日現在

機関番号：　３２６１２
研究種目：　挑戦的萌芽研究
研究期間：　2015～2016
課題番号：　１５Ｋ１５００７

研究課題名（和文）胎児防御における関門遷移現象に基づく妊婦薬物療法の精緻化基盤

研究課題名（英文）Medication for pregnant women based on 'barrier transition' behavior in feto-placental circulation

研究代表者

登美　斉俊（Tomi, Masatoshi）

慶應義塾大学・薬学部（芝共立）・教授

研究者番号：３０３３４７１７

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）：妊娠進行に伴って、胎盤関門において特にグルコーストランスポーター(GLUT1)やモノカルボン酸トランスポーター（MCT1）など、胎児への栄養供給を担うトランスポーターのタンパク発現量は大きく変化する一方で、MDR1やBCRPの変動は大きくないことが明らかとなり、胎盤関門の可塑的な変化をタンパク発現量として明確にすることができた。さらに、胎盤関門と胎児血液脳関門の両方を機能制御しうる胎盤由来miRNAを見出すことができた。本研究成果を基盤として、胎盤および胎児脳血管内皮細胞形成と協調的な機能制御に関わる臓器間ネットワークの解明につながることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：We have clarified the developmental change in the placental transporters such as glucose transporter 1 (GLUT1) and monocarboxylate transporter 1 (MCT1), while the expressions of ABC transporters such as MDR1 and BCRP were unchanged during pregnancy. We also found a placenta-derived miRNA which may work for maturation of both placental and blood-brain barrier. These observations are helpful for examining the interorgan network in the fetoplacental circulation for establishing and managing barriers in the placenta and the brain.

研究分野：　薬物動態学

キーワード：　胎盤関門　miRNA

１．研究開始当初の背景

妊娠は大まかに初期・中期・後期に分けられるが、妊婦薬物療法のリスク評価は主に初期とそれ以外（中期・後期）に区分される。胎盤未形成の初期は過敏期とされ、催奇形性リスクが高く薬物使用に最も注意すべき時期である。妊娠中期以降も胎児への機能的影響を避けるために多くの薬の使用が禁忌となるなど、薬物の選択には細心の注意が払われる。しかし、選択基準の１つである胎児移行性は出産後の満期ヒト胎盤透過性で決められているのが現状である。母体-胎児間物質交換の需要は妊娠進行に伴って増大するため、妊娠末期のヒト胎盤関門は表面積が 13 m^2 に達し、P-糖タンパク質および BCRP/ABCG2 発現量は低下している。そのため、ヒト満期胎盤透過性に頼った薬物胎児移行性の推定では精度に問題がある。

胎盤バリア機能変動の理由は、胎児自らの防御機構発達によって補完されるためと説明できるが、代表者は特にマウス胎生 15.5 日における血液脳関門形成 (Nature 2014;509:507-11, Nature 2010;468:562-6)、およびマウス胎児脳内における神経伝達物質セロトニンの供給源が胎生 15.5 日までは胎盤、15.5 日以降は脳であるとの報告 (Nature 2011;472: 347-50)に着目した。胎児血液脳関門形成前の胎児脳においては、胎盤関門が必須の役割を果たす必要があるため、胎生 15.5 日における胎児血液脳関門形成には胎盤との協調制御が関与すると考えることは自然である。つまり、胎児血液脳関門形成時における臓器間ネットワークが、胎児胎盤系における関門機能制御において重要な役割を果たす可能性が高い。

２．研究の目的

本研究では、胎盤関門の可塑性を明らかにし、その制御を担う胎盤由来情報伝達物質を明らかにすることを目的とする。本研究を通じて、妊娠中期と妊娠後期における関門機能変動とそのメカニズムを解析することで、胎盤関門の存在しない初期、胎盤関門が強く働く中期、そして脳関門の影響を考慮すべき後期の 3 段階に細分化して薬物使用リスクを評価し、妊婦薬物療法をより合理的基準に基づいて判断可能とするための萌芽となる。

３．研究の方法

胎盤刷子縁膜ベシクルの調製: 妊娠マウス胎盤の迷路部ホモジネートから分画遠心法を用いて粗膜画分を調製した。

タンパク発現量の定量: 調製した膜画分におけるトランスポータータンパクの発現量を western blot 法で定量することで、細胞膜画分における膜タンパクの濃縮を確認した。Trypsin 消化した細胞膜画分に存在するトランスポータータンパク断片を LC-MS/MS で定量した。各タンパクの絶対発現量は、内部標準法により算出した。

胎盤透過性解析: 麻酔下で妊娠マウスを開腹し、放射標識した被験化合物と対照であるアンチピリンとの混合液を腹部大動脈下部に急速投与し、5 秒後に子宮頚に最も近い側の胎児を摘出し放射活性を測定した。

細胞培養: Forskolin 曝露またはリポフェクション法によって miR-126 mimic を導入した JEG-3 細胞において、miR-126 及び各種遺伝子の mRNA 発現量をマイクロアレイで網羅的に定量したのち、大きく変動が示された分子については定量 PCR 法で変動を確認した。

エクソソームの機能評価: JEG-3 細胞の培養上清からエクソソームを抽出し、HepG2 細胞の培養液中に添加した。HepG2 細胞より micro RNA および total RNA を抽出し、JEG-3 細胞由来の miRNA および各種薬物代謝酵素の mRNA 発現量を定量 PCR 法で定量した。

４．研究成果

妊娠 12.5、15.5（血液脳関門形成日）および 18.5 日目（出産前日）のマウス粗膜画分における MDR1A および MDR1B のタンパク発現量は、それぞれ 2.4-3.0 fmol/μg-protein および 0.59-0.79 fmol/μg-protein の範囲に収まり、有意な変動は示されなかった。BCRP のタンパク発現量は妊娠 12.5、15.5 および 18.5 日目胎盤においてそれぞれ 1.2、1.9 および 1.8 fmol/μg-protein であり、12.5 日目と比較して 18.5 日目において 1.5 倍有意に上昇したものの、顕著な増加は示されなかった。一方、妊娠 12.5 日目に対して妊娠 18.5 日目胎盤における monocarboxylate transporter (MCT) 1 および GLUT1 のタンパク発現量は、それぞれ 15 から 46 fmol/μg protein に 3.2 倍、21 から 130 fmol/μg protein に 6.3 倍有意に増加していることが示された。細胞膜画分において、栄養供給を担うこれら SLC トランスポーターは大きく絶対発現量が上昇するのに対して、薬剤排出を担う ABC トランスポーターの発現量変動は比較的小さいことが明らかとなった。

ABC トランスポーターの機能変動については、Bcrp knockout mouse において胎児移行性が上昇することが報告されている (Mol Pharmacol 2008;73:949-59)glyburide を選択し、[^{3}H]glyburide の胎児移行性推移を解析した。胎児移行性の指標となる Fetal uptake index (FUI)値は妊娠 12.5、15.5、17.5、および 18.5 日目においていずれも 17-19%であった。各妊娠日数において、[^{3}H]glyburide の[^{14}C]antipyrine に対する胎児移行性に有意な変動は示されなかった。少なくともげっ歯類において、胎盤関門における Bcrp のタンパク絶対発現量の変動が基質薬物の胎児移行性に与える影響が検出できなかったことから、妊娠進行に伴う胎盤関門における Bcrp 発現量変動の影響は軽微であると推測される。以上の結果から、胎盤関門の主要機能の一つである、排出トランスポーターのタンパク発現および輸送機能は、いずれも妊娠

進行に伴う変化が小さいことが示された。これは、これまでの報告に基づく我々の予測とは異なり、予想外であった。しかし、栄養供給を担うトランスポーターの発現量は妊娠進行に伴って大きく変動することが明らかとなったため、胎盤関門の可塑的な変化をタンパク発現量として明らかにすることができた。

次に胎児胎盤系における胎盤バリア機能変動を担う情報伝達分子として、胎盤由来 miRNA に着目した解析を行った。胎盤関門の成熟には protein kinase A (PKA)が関与することが報告されている。ヒト絨毛癌由来で胎盤関門モデルとして汎用される JEG-3 細胞に対し、PKA アゴニストである forskolin を添加して培養し、miRNA 発現変動をマイクロアレイで網羅的に解析した結果、miR-126 の発現変動が特に大きく、少なくとも 3 倍に上昇することが示された。miR-126 の導入によって発現変動を受ける遺伝子についてもマイクロアレイを用いて網羅的に解析した結果、最も発現上昇した遺伝子が、胎盤関門形成時の合胞体化および胎児血液脳関門の形成に必要な膜タンパクである MFSD2A であることが示された。さらに、JEG-3 細胞からの分泌小胞（エクソソーム）を HepG2 細胞に添加することで、HepG2 細胞から胎盤特異的 miRNA である miR-517-3p が検出されること、そして HepG2 細胞における薬物代謝酵素の発現量を変動させることを明らかにした。妊娠高血圧腎症のヒト胎盤において miR-126 の発現量が減少していること(J Int Med Res 2014;42:1243-51)、妊娠高血圧腎症モデルマウスに miRNA-126 を導入することで胎児成長が改善することが報告されているため(Placenta 2014;35:23-29)、miRNA-126 は胎児成長への関与が示唆される。以上から、胎盤関門に発現する miR-126 は MFSD2A の発現を誘導することで胎盤関門の形成に関与するだけでなく、エクソソームに内包されて分泌されるため、胎児血を循環し、胎児脳血管内皮細胞における MFSD2A の発現を誘導することで血液脳関門の形成を促す可能性が示された。

結論として、妊娠進行に伴って、胎盤関門において特に胎児への栄養供給を担うトランスポーターのタンパク発現量は大きく変化することを明らかにすることができた。さらに、関門機能制御を担う胎盤由来 miRNA を見出すことができた。本研究成果を萌芽として、胎盤および胎児脳血管内皮細胞形成と協調的な機能制御に関わる臓器間ネットワークの全体像解明につながることが期待できる。

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) Noguchi S, Nishimura T, Mukaida S, Benet LZ, Nakashima E, Tomi M. Cellular uptake of levocetirizine by organic anion transporter 4. J Pharm Sci. 査読有, 印刷中. DOI: 10.1016/j.xphs.2017.03.026.

(2) Inagaki M, Nishimura T, Akanuma S, Nakanishi T, Tachikawa M, Tamai I, Hosoya K, Nakashima E, Tomi M. Co-localization of microsomal prostaglandin E synthase-1 with cyclooxygenase-1 in layer II of murine placental syncytiotrophoblasts. Placenta. 査読有, 53, 2017, 76-82. DOI: 10.1016/j.placenta.2017.04.002.

(3) Takagi A, Nishimura T, Akashi T, Tomi M, Nakashima E. Contribution of equilibrative nucleoside transporter (ENT) 2 to fluorouracil transport in rat placental trophoblast cells. Drug Metab Pharmacokinet. 査読有, 32(2), 2017, 151-156.
DOI: 10.1016/j.dmpk.2016.12.001.

(4) Takahashi Y, Nishimura T, Maruyama T, Tomi M, Nakashima E. Contributions of system A subtypes to α-methylaminoisobutyric acid uptake by placental microvillous membranes of human and rat. Amino Acids. 査読有, 49(4), 2017, 795-803. DOI: 10.1007/s00726-017-2384-7.

(5) Akashi T, Nishimura T, Takaki Y, Takahashi M, Shin BC, Tomi M, Nakashima E. Layer II of placental syncytiotrophoblasts expresses MDR1 and BCRP at the apical membrane in rodents. Reprod Toxicol. 査読有, 65, 2016, 375-381. DOI: 10.1016/j.reprotox.2016.09.002.

〔学会発表〕（計 10 件）

(1) 斉藤慶、西村友宏、中島恵美、登美斉俊. Hypotaurine およびその供給因子の胎盤組織内分布. 日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月 24-27 日, 仙台国際センター（宮城県・仙台市）.

(2) 山下稔貴、西村友宏、中島恵美、登美斉俊. 胎盤を介した胎児からのクレアチニン排出輸送機構の解析. 日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月 24-27 日, 仙台国際センター（宮城県・仙台市）.

(3) 西村友宏、樋口慧、中島恵美、登美斉俊. SLC6A ファミリーによるヒポタウリン輸送と酸化ストレスに対する細胞保護作用. 第 38 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2016 年 11 月 17-18 日, 名古屋市立大学大学院薬学研究科（愛知県・名古屋市）.

(4) 登美斉俊、野口幸希、向田紗也、西村友宏、中島恵美．ヒト有機アニオントランスポーターOAT4 を介したセチリジン輸送．日本薬剤学会第31年会，2016年5月19-21日，長良川国際会議場（岐阜県・岐阜市）．

(5) 西村友宏、吉田裕子、樋口慧、登美斉俊、中島恵美．Slc6a GABA/taurine トランスポーターによるヒポタウリン輸送活性の比較．日本薬学会第136年会，2016年3月26-29日，パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）．

(6) 向田紗也、野口幸希、西村友宏、登美斉俊、中島恵美．ヒトOAT4を介したH1ブロッカーの輸送評価．日本薬学会第 136 年会，2016年3月26-29日，パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）．

(7) 野口幸希、篠原裕美、阿部真希子、西村友宏、登美斉俊、中島恵美．ヒト OAT4 の臓器特異的転写制御に転写開始点の違いが与える影響．日本薬学会第136年会，2016年3月26-29日，パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）．

(8) Tomi M, Akashi T, Takaki Y, Nishimura T, Nakashima E. Syncytiotrophoblast layer 2 expresses MDR1 and BCRP efflux transporters in rodent placenta. International Federation of Placenta Associations (IFPA) 2015, 2015年9月8-11日，Brisbane（Australia）．

(9) 明石知也、西村友宏、高木良也、登美斉俊、中島恵美．げっ歯類胎盤関門における MDR1 および BCRP の局在とヒトとの種差．2015 年 6 月 20-21 日，慶應義塾大学薬学部（東京都・港区）．

(10) 登美斉俊.関門トランスポーターによる薬物組織分布制御機構の研究．第 10 回トランスポーター研究会年会，日本薬剤学会第30年会，2015年5月21-23日，長崎ブリックホール（長崎県・長崎市）．

６．研究組織

(1)研究代表者

登美　斉俊（TOMI MASATOSHI）
慶應義塾大学・薬学部・教授
研究者番号：３０３３４７１７

(2)研究分担者

西村　友宏（NISHIMURA TOMOHIRO）
慶應義塾大学・薬学部・専任講師
研究者番号：４０４５３５１８

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし