

平成25年度食品健康影響評価技術研究成果発表会

I 化学物質関連分野(胎児期・発達期の暴露に関する研究)

研究開発
課題名:

胎盤移行性における種差を反映した
ヒト胎児毒性リスク評価手法の開発

研究代表者:

登美 斉俊 (慶應義塾大学薬学部・准教授)

薬剤学講座

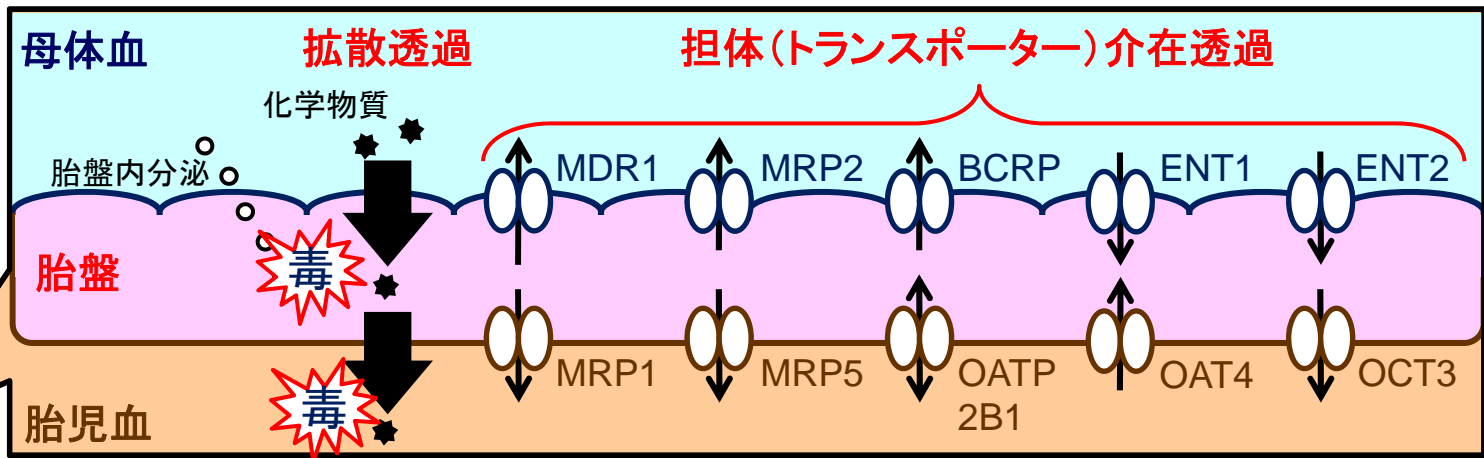
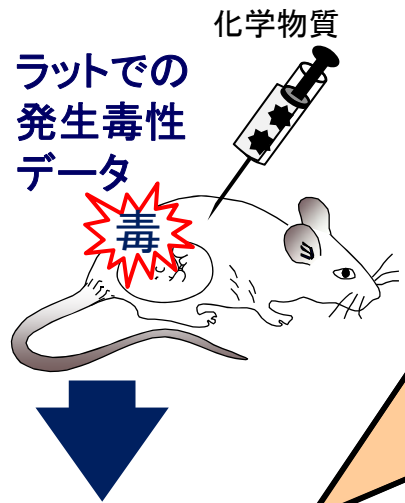
組織関門を介した物質透過メカニズムの研究

胎児期・発達期栄養環境が生活習慣病発症に及ぼす影響の研究

研究分担者:

丸山 哲夫 (慶應義塾大学医学部・専任講師) 産婦人科学教室生殖内分泌研究室
産科
不育症、子宮由来疾患の病因解明

ヒト胎児毒性リスク評価の現状・課題



胎児・胎盤移行性の種差

化学物質の胎児・胎盤移行性はヒト・ラット共に、胎盤関門を介した
 ①脂溶性に従った拡散透過
 ②トランスポーターを介した選択的透過によって規定

標的細胞での感受性種差

但し、輸送速度、トランスポーター発現量には動物種差が存在

胎盤関門細胞膜透過機構に関わる定量的情報の欠如により、動物データからのヒト胎児・胎盤移行性予測が現状では不可能



①胎盤拡散透過速度
 ②胎盤トランスポータータンパク発現量
 ③胎盤トランスポーター輸送能力

の定量的情報基盤を各々構築することで、ラット胎児・胎盤移行性からヒト移行性を高精度に外挿させた、動物種差を反映したヒト胎児毒性リスクの評価手法が開発できる。

**MULTIPLE SYNCYTIN CAPTURES
(variable extent of syncytialization)**

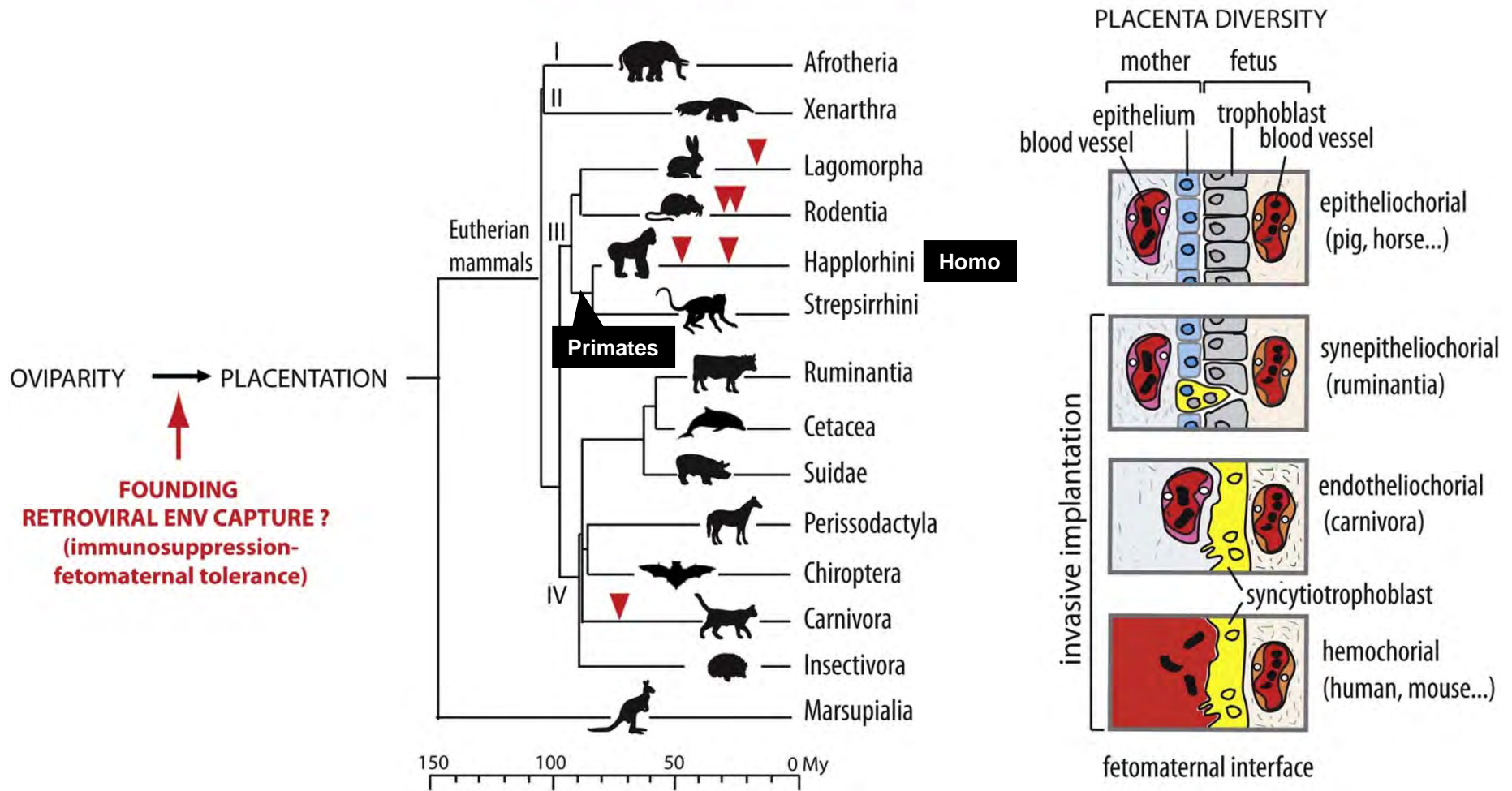
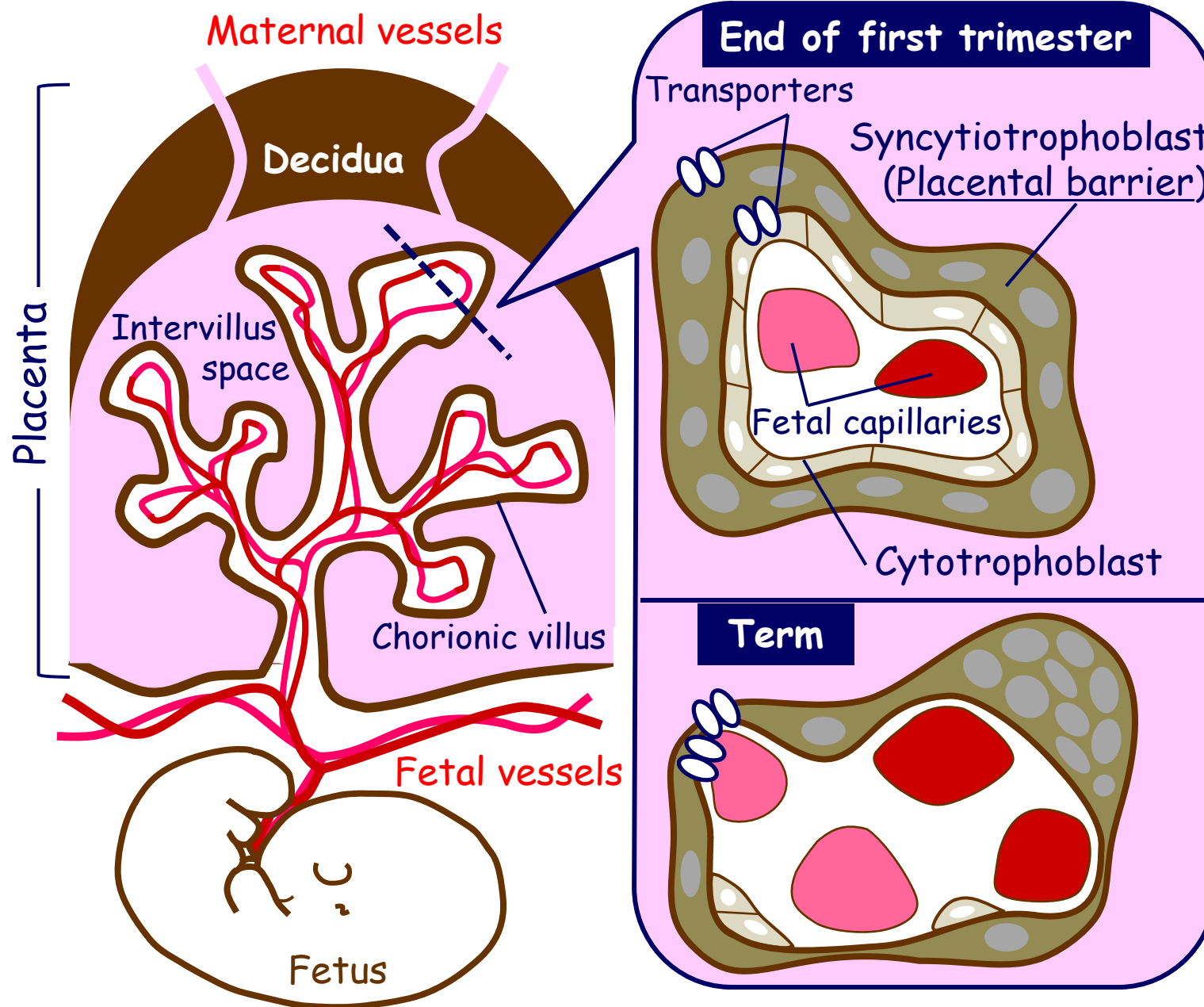


Fig. Multiple captures of syncytin genes across evolution and diversity of placental structures in mammals. The phylogenetic tree of mammalian evolution shows the time of insertion of the six syncytin genes identified to date (middle). Roman figures indicate the four major eutherian clades: Afrotheria (I), Xenarthra (II), Euarchootoglires (III) and Laurasiatheria (IV). At this time, syncytins have been identified in the Euarchootoglires (primates, muroids and leporids) and Laurasiatheria (carnivores) classes. Capture of varied syncytins with differing properties and expression sites could explain the observed diversity of placenta organization among mammalian species. The right panel shows a schematic representation of the materno-fetal interface in the four main types of placental structures. Placental types are classified in order of increasing invasive properties and extent of syncytialization.



Structure of the human placental barrier

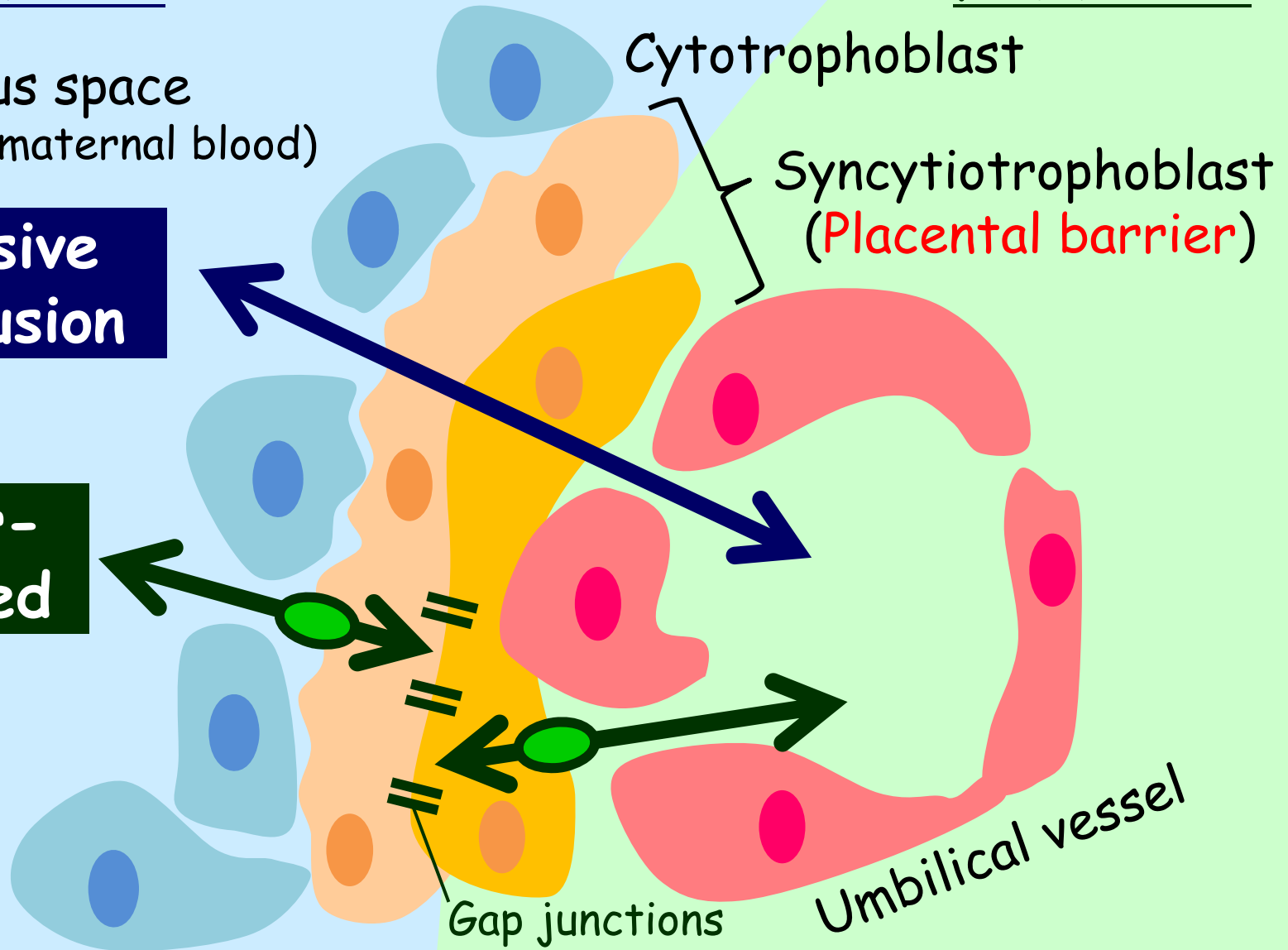
Maternal side

Fetal Side

Intervillous space
(Filled with maternal blood)

Passive
diffusion

Carrier-
mediated



Fetal drug transfer mechanisms across the rodent placental barrier

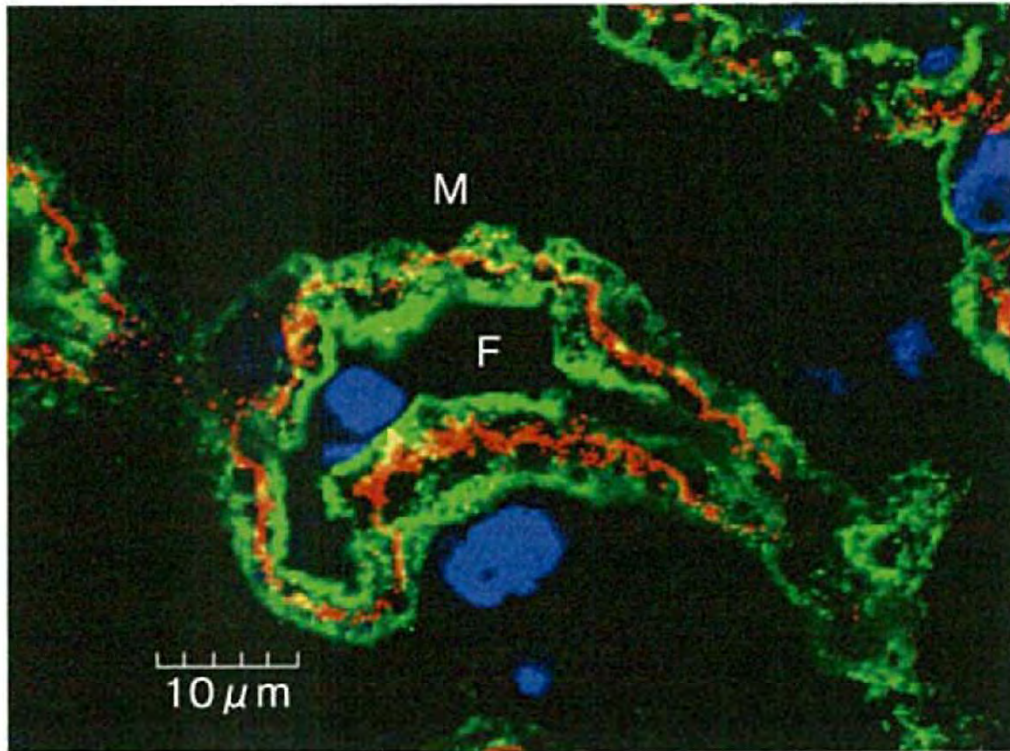


図1 ラットシンシチオトロフォブラスト(ST)層における GLUT1 (緑)およびコネキシン26(赤)の局在

M : 母体血側, F : 胎児血側。

登美, 産婦人科の実際 62(8), 1041-1046 (2013).

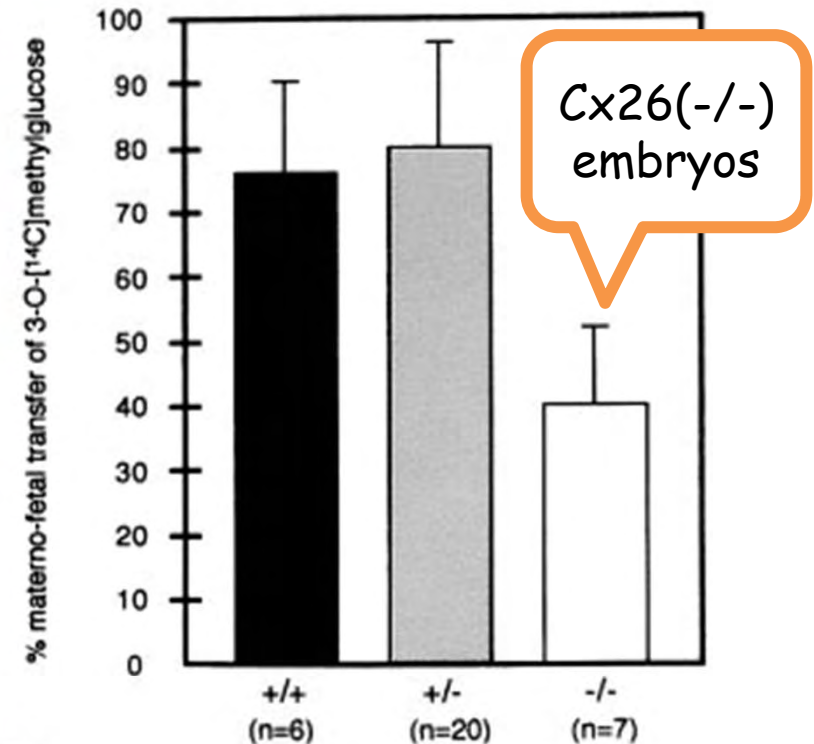


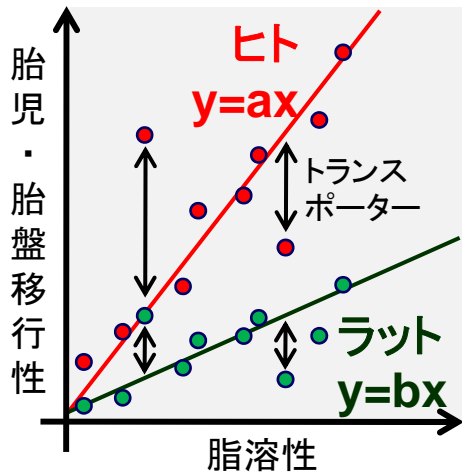
Fig. Uptake of 3-O-[¹⁴C]methyl-D-glucose into whole embryos at day 10 pc from maternal blood across the placenta

Decreased accumulation of radioactivity was measured in homozygous Cx26-defective embryos compared with heterozygous and wild-type embryos.

Gabriel et al., *J Cell Biol* 140:1453-1461 (1998).

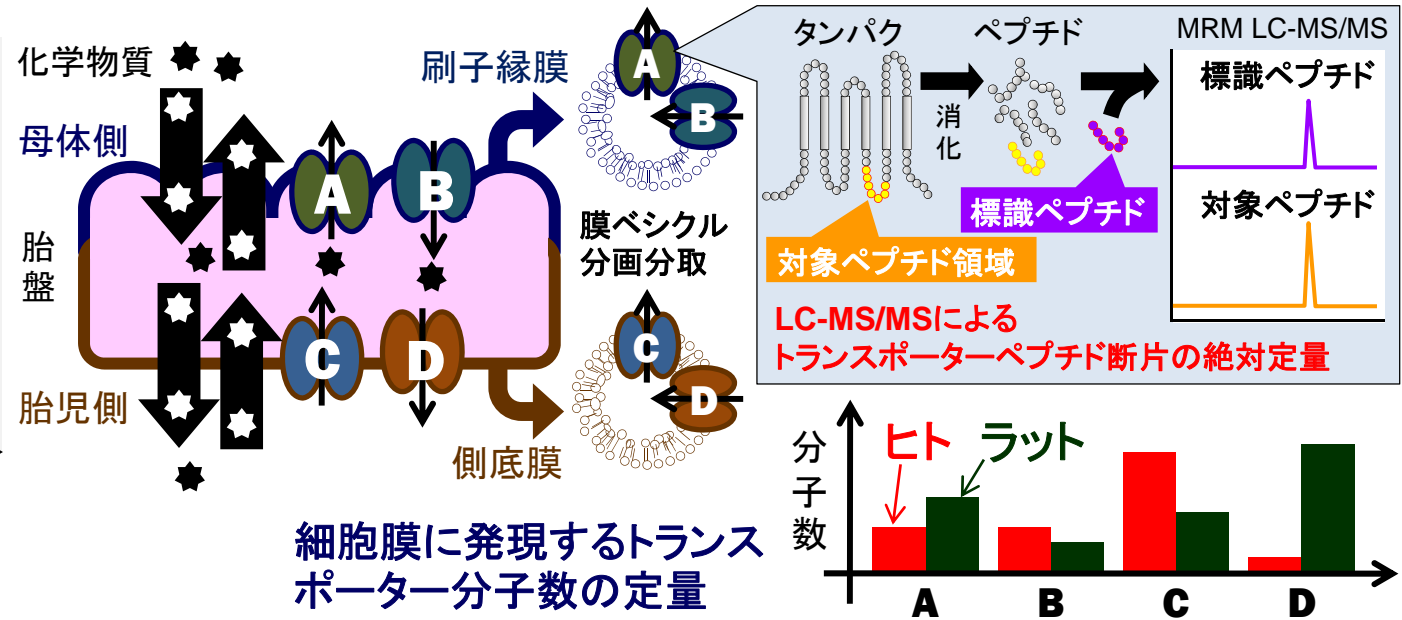
Glucose transfer mechanisms across the rodent placenta

1. 「拡散透過」における種差の解明



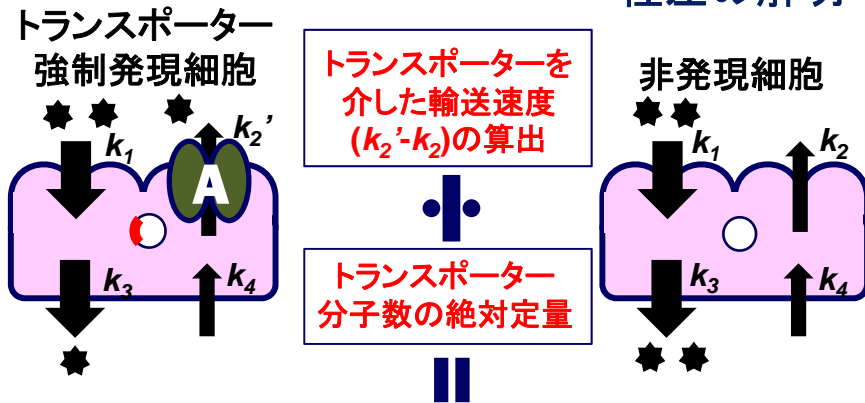
ヒト/ラット拡散移行比の算出

2. 「胎盤トランスポーター発現量」における種差の解明



細胞膜に発現するトランスポーター分子数の定量

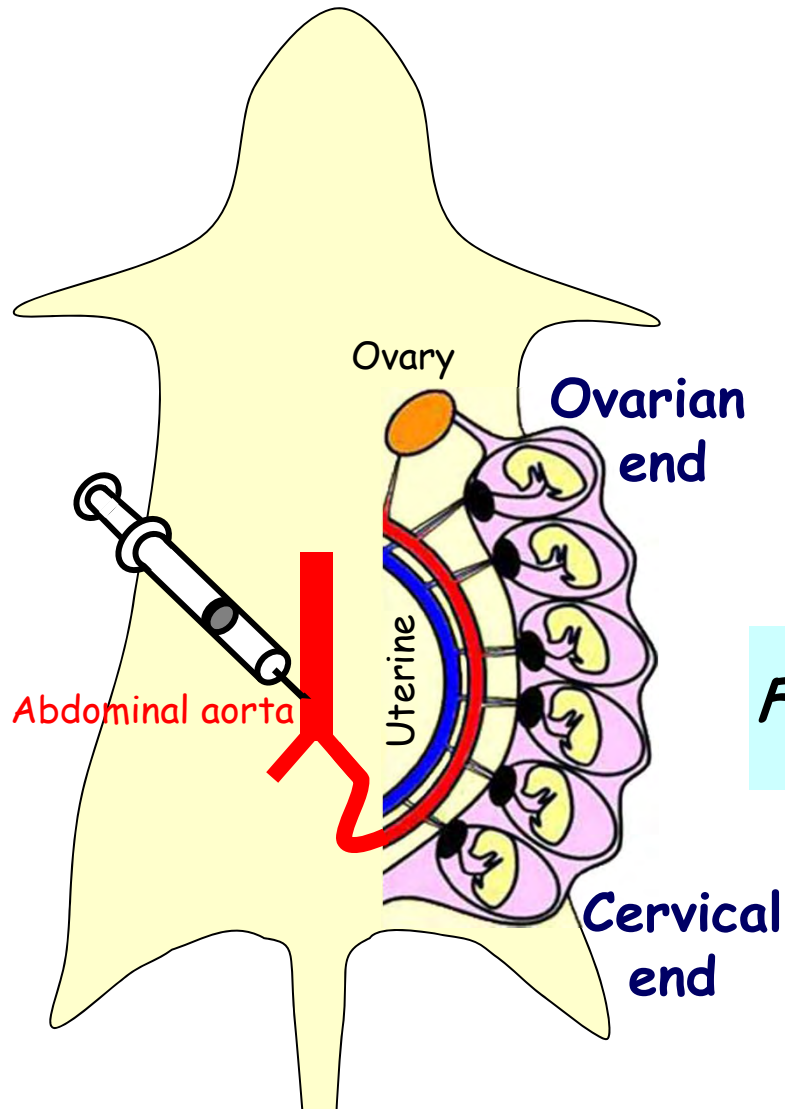
3. 「胎盤トランスポーター機能」における種差の解明



トランスポーター1分子あたりの輸送活性を算出

「胎盤移行性における種差を反映したヒト胎児毒性リスク評価手法の開発」研究の全体構想

1) 胎盤拡散透過における種差の解明



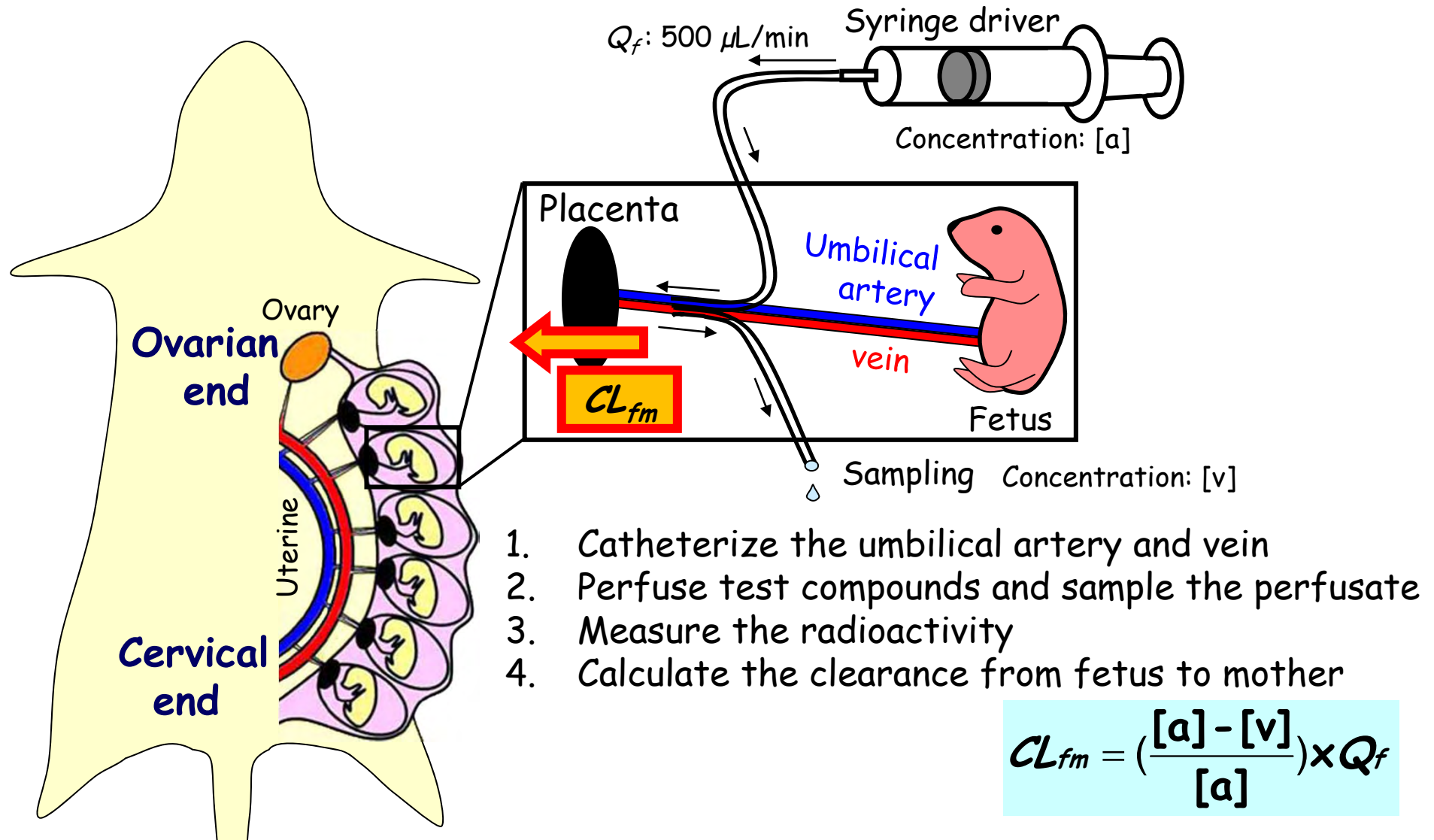
1. Inject the bolus containing the compound of interest and antipyrine (reference compound) into the abdominal aorta of the pregnant rat (GD19) under anesthesia
2. Isolate the fetus at cervical end 10 seconds after the injection
3. Measure the radioactivity
4. Calculate the uptake ratio to antipyrine (reference compounds)

$$FUI = \frac{[\text{test}]/[\text{antipyrine}](\text{dpm, fetus})}{[\text{test}]/[\text{antipyrine}](\text{dpm, injectate})}$$

FUI ; fetal uptake index

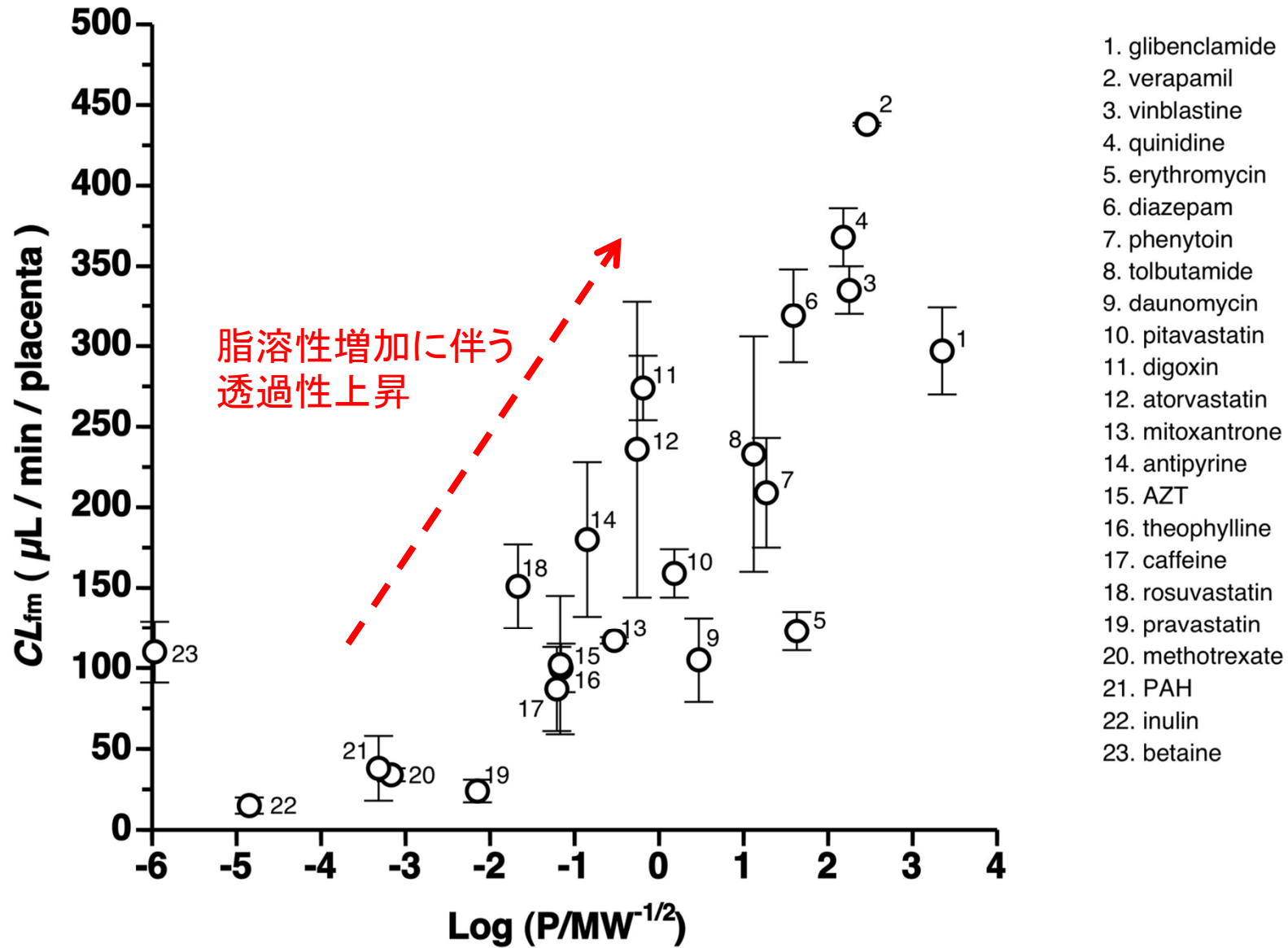
Experimental method for evaluation of the maternofetal transfer across the rat placenta

1) 胎盤拡散透過における種差の解明



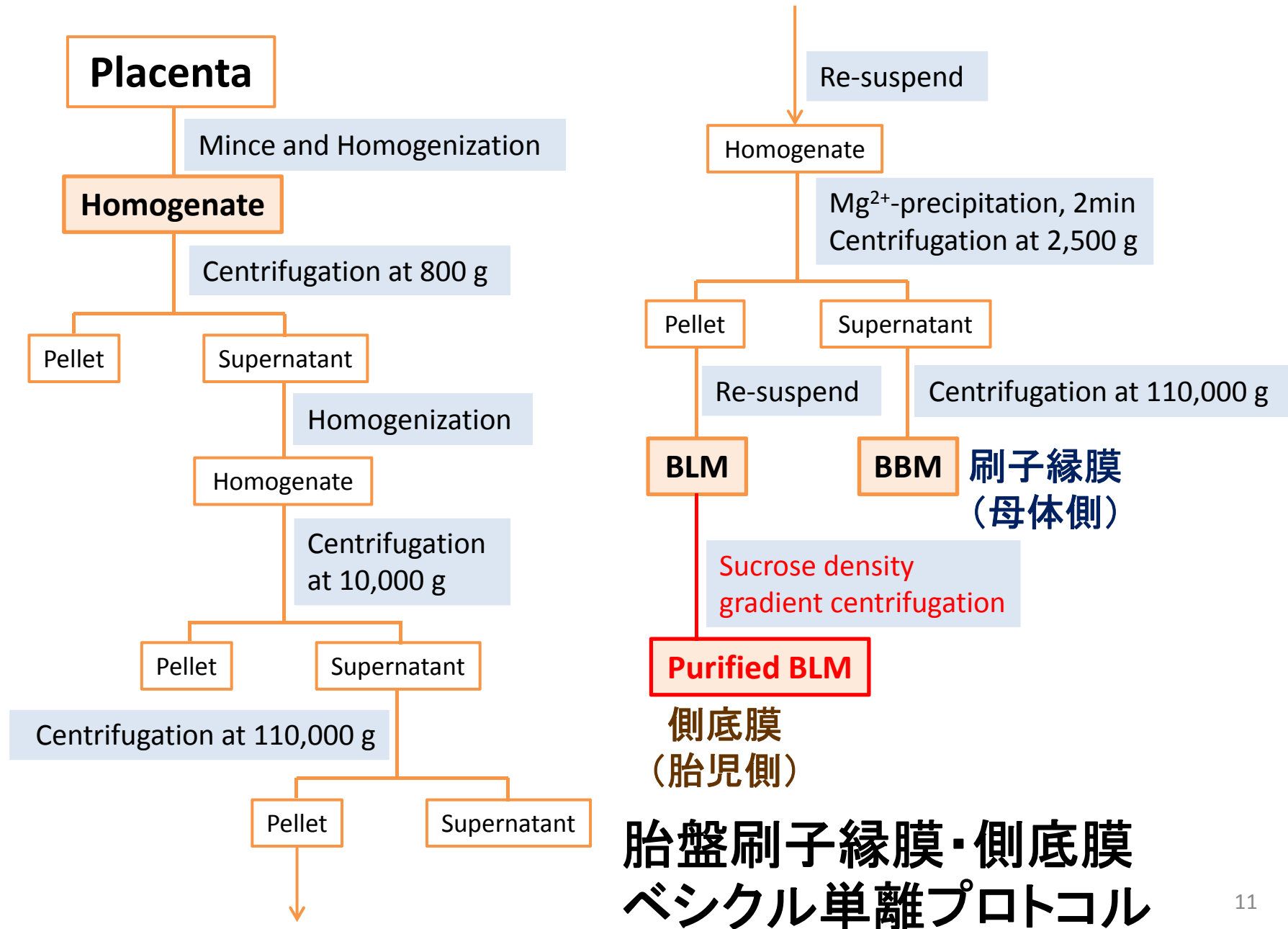
Experimental method for evaluation of the fetomaternal transfer across the rat placenta

1) 胎盤拡散透過における種差の解明



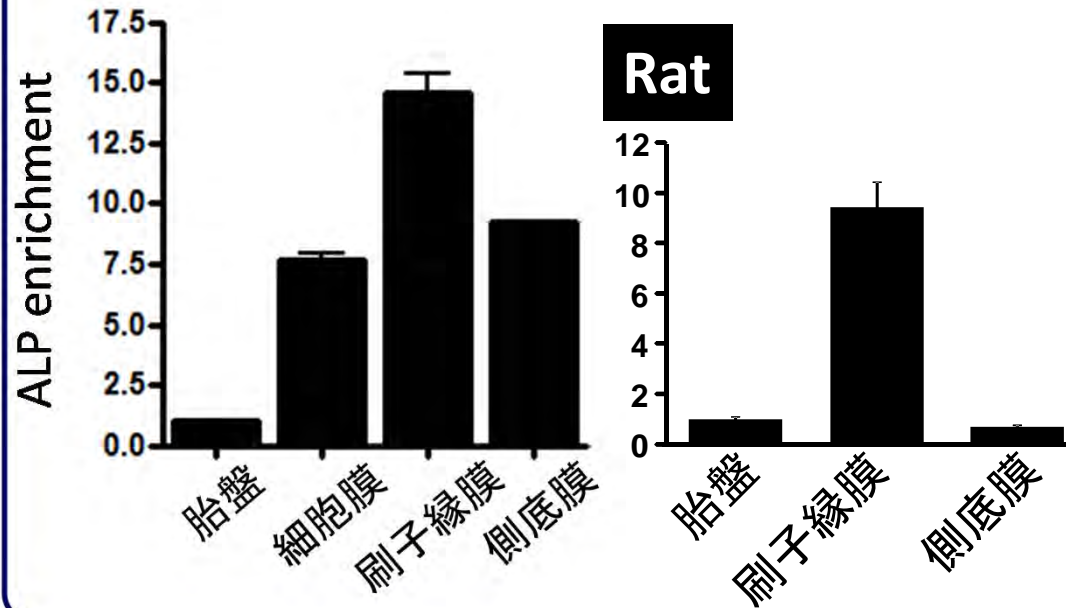
脂溶性・分子量と胎児から母体への胎盤透過性との相関性

2) 胎盤トランスポーター発現量における種差の解明

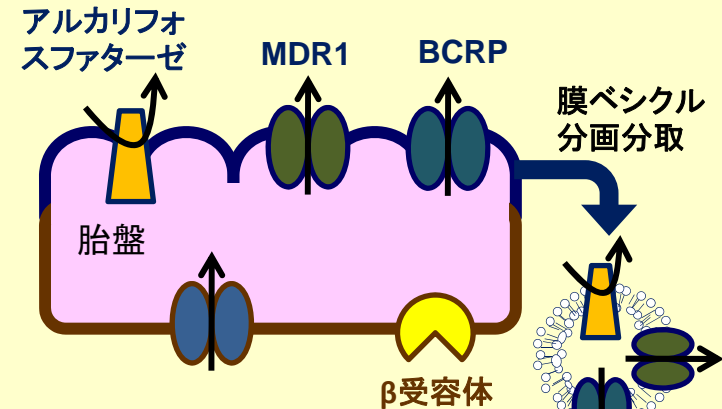


2) 胎盤トランスポーター発現量における種差の解明

Human アルカリフォスファターゼ活性

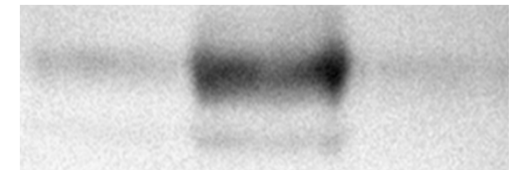


Brush-Border membrane (BBM; Maternal side)

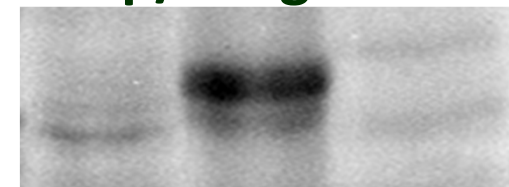


Basolateral membrane (BLM; Fetal side)

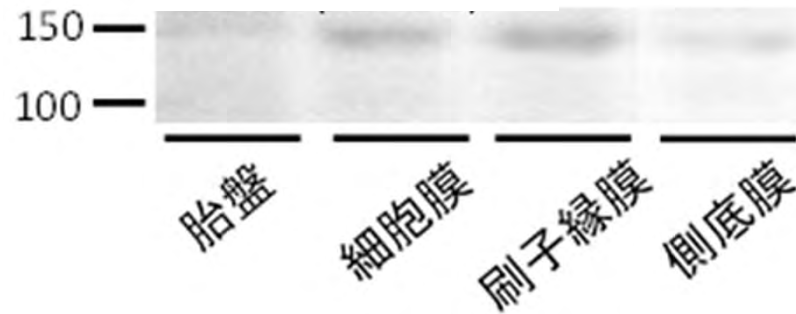
Rat Mdr1/Abcb1



Bcrp/Abcg2

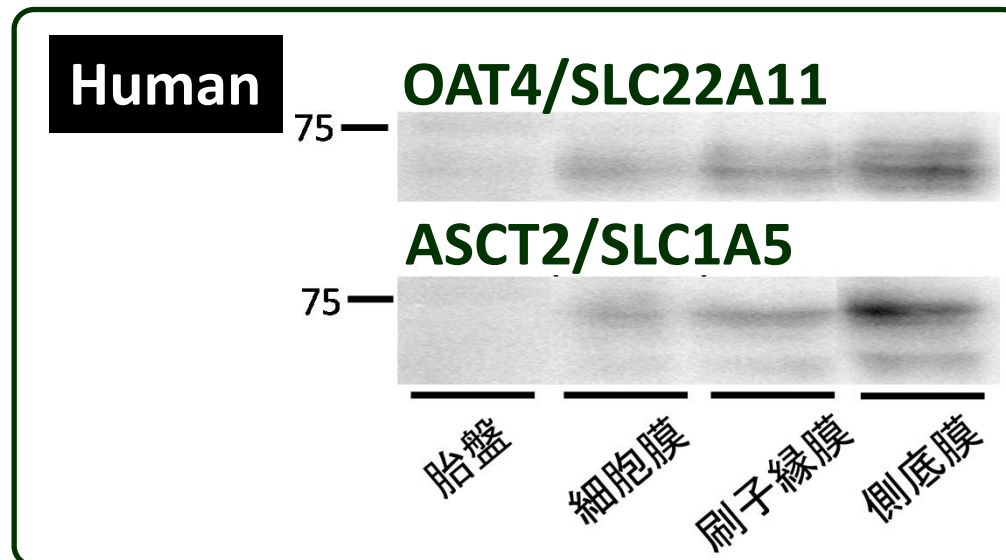
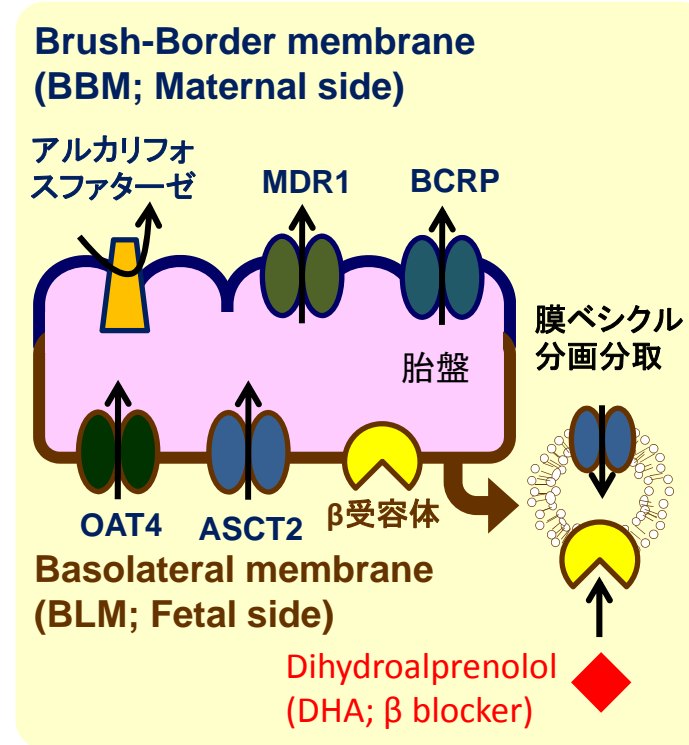
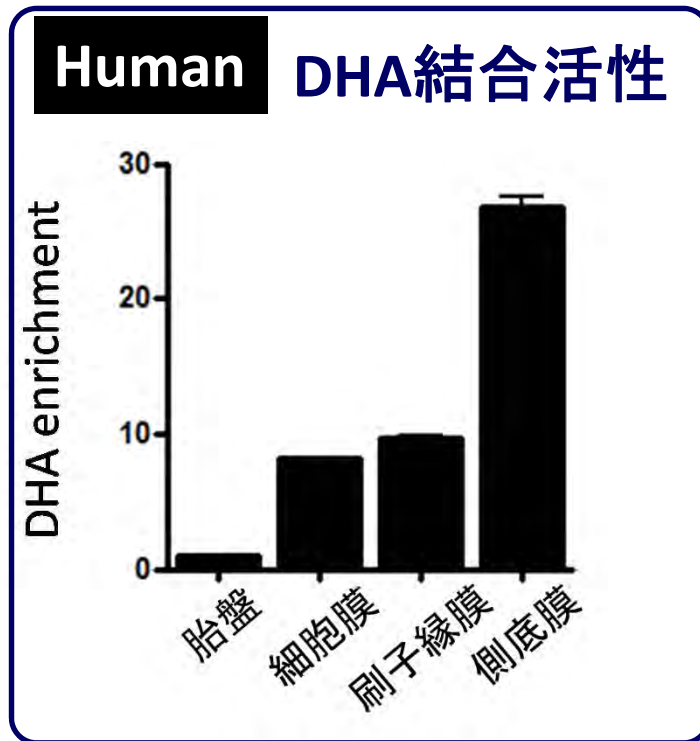


Human MDR1/ABCB1



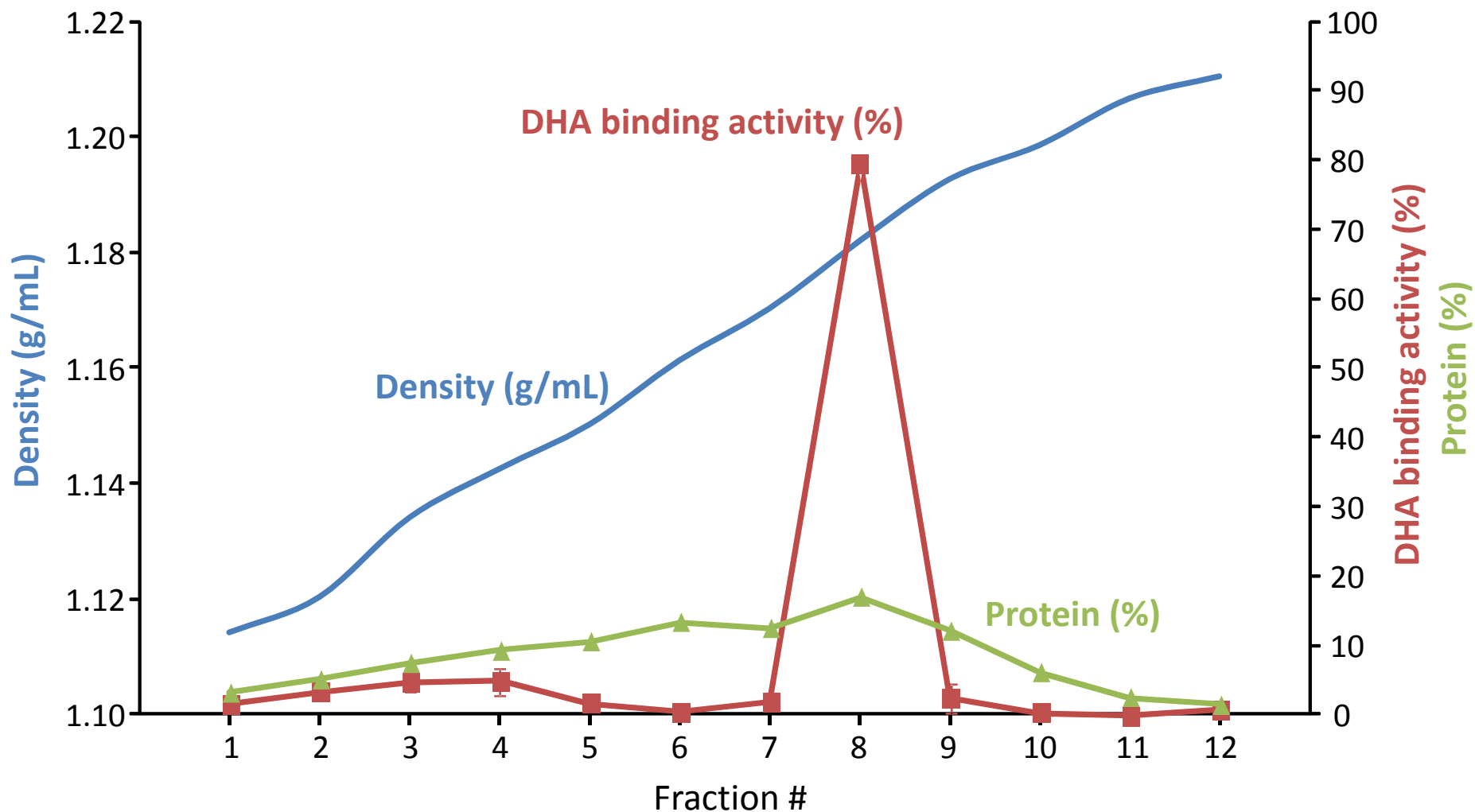
胎盤刷子縁膜ベシクルの評価

2) 胎盤トランスポーター発現量における種差の解明



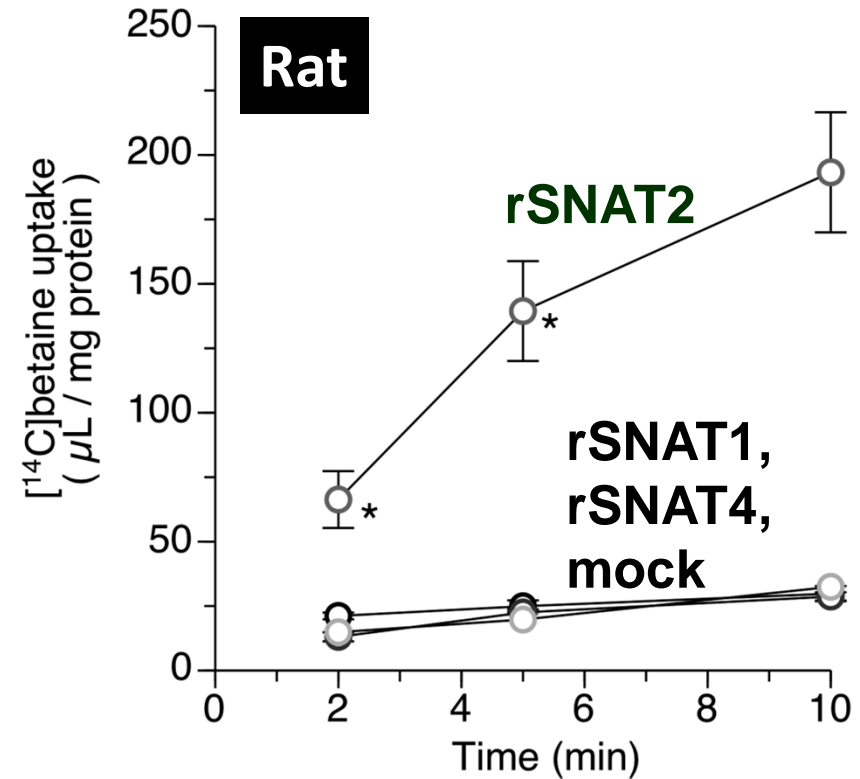
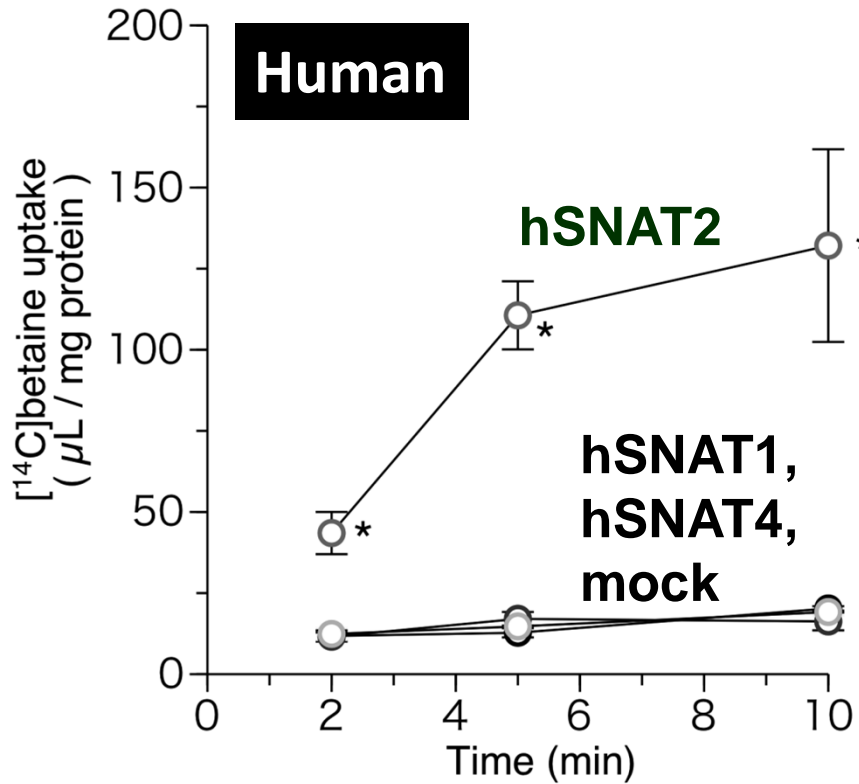
胎盤側底膜
ベシクルの評価

2) 胎盤トランスポーター発現量における種差の解明



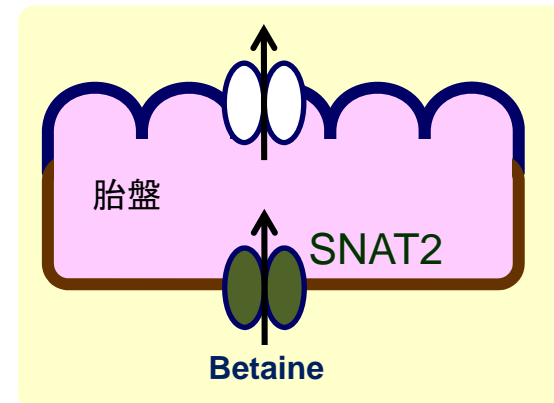
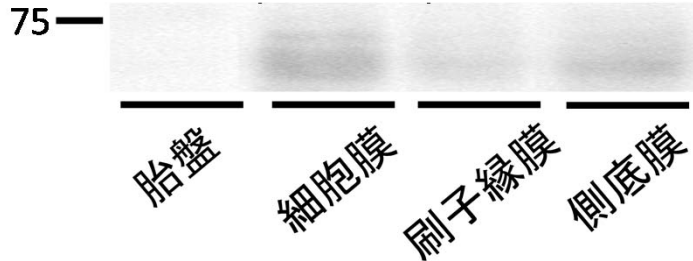
密度勾配遠心によるラット胎盤側底膜ベシクル精製の検討

3) 胎盤トランスポーター機能における種差の解明



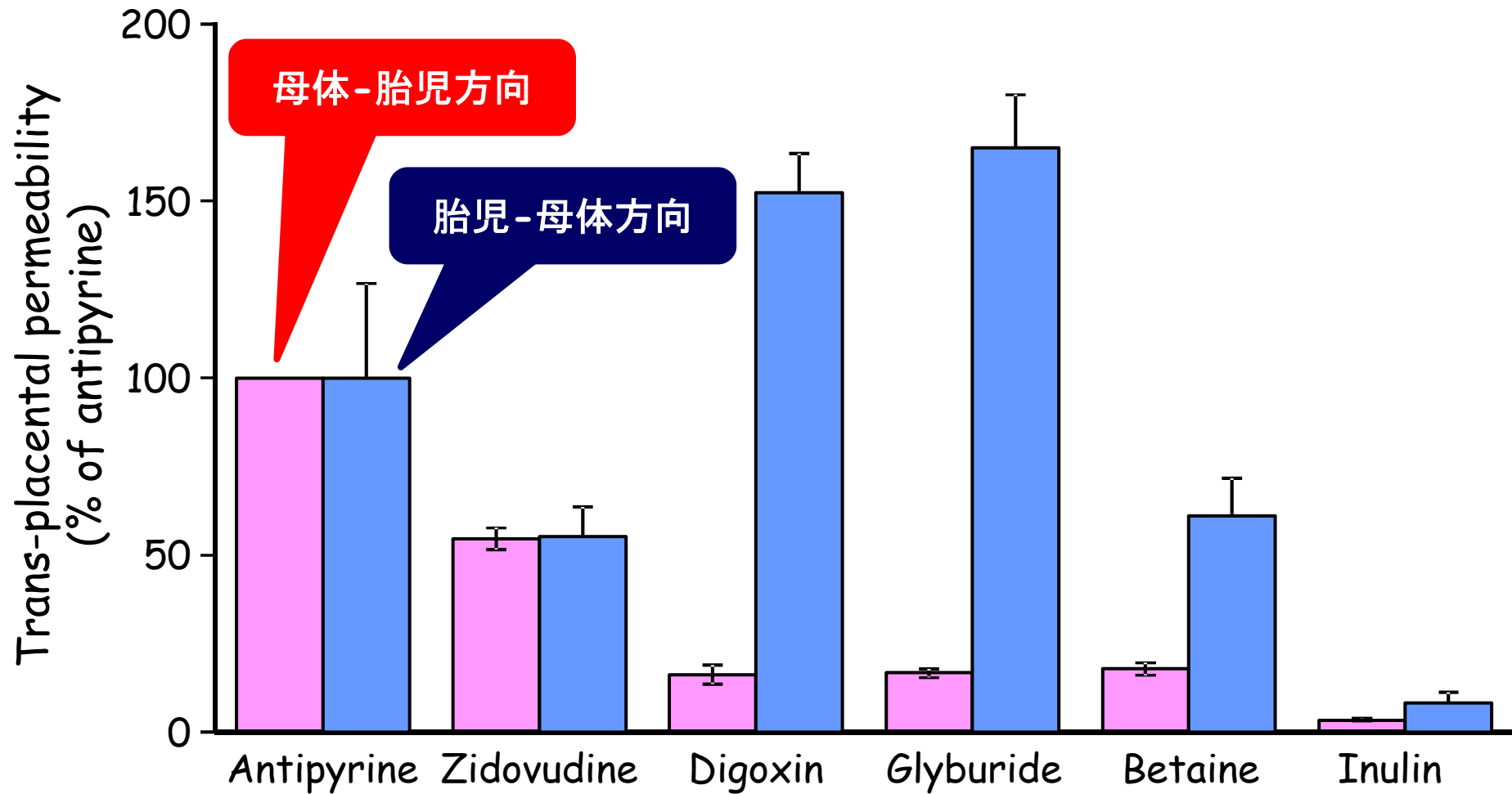
Human

SNAT2/SLC38A2



SNAT2を介したベタイン輸送機構

排出トランスポートー機能種差



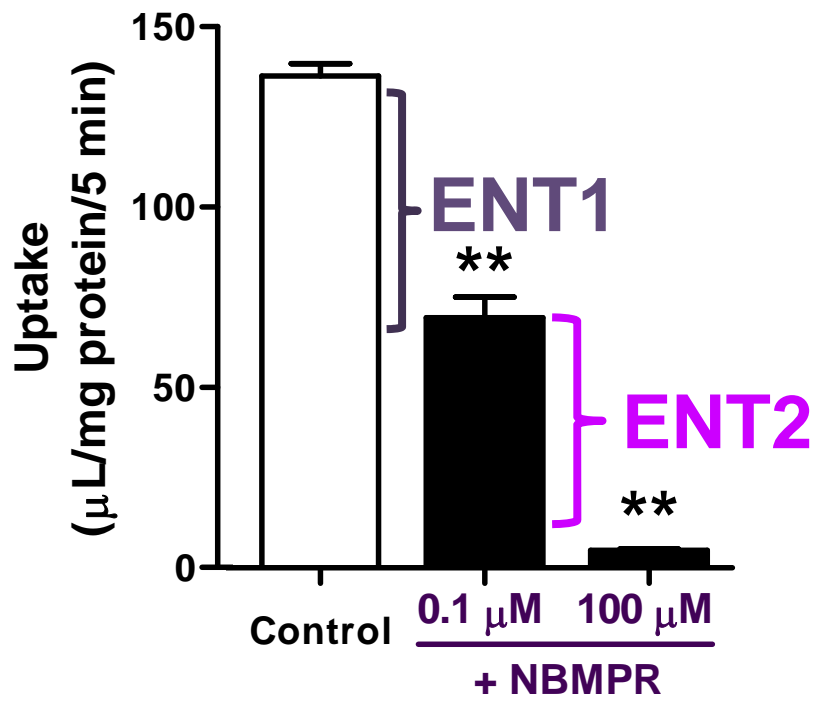
母体-胎児方向と胎児-母体方向の胎盤透過性の比較

登美, *Drug Delivery System* 28(4) (2013).

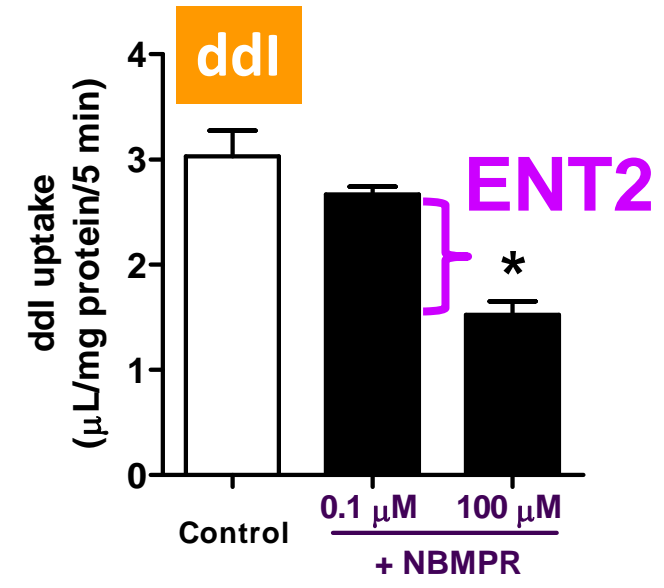
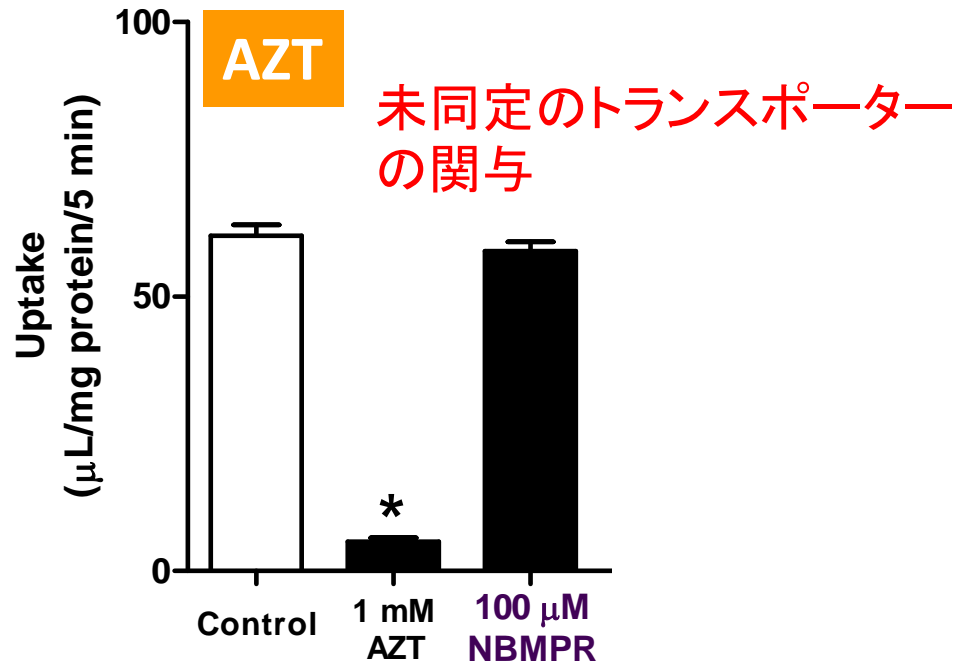
胎盤ヌクレオシド輸送の分子実体

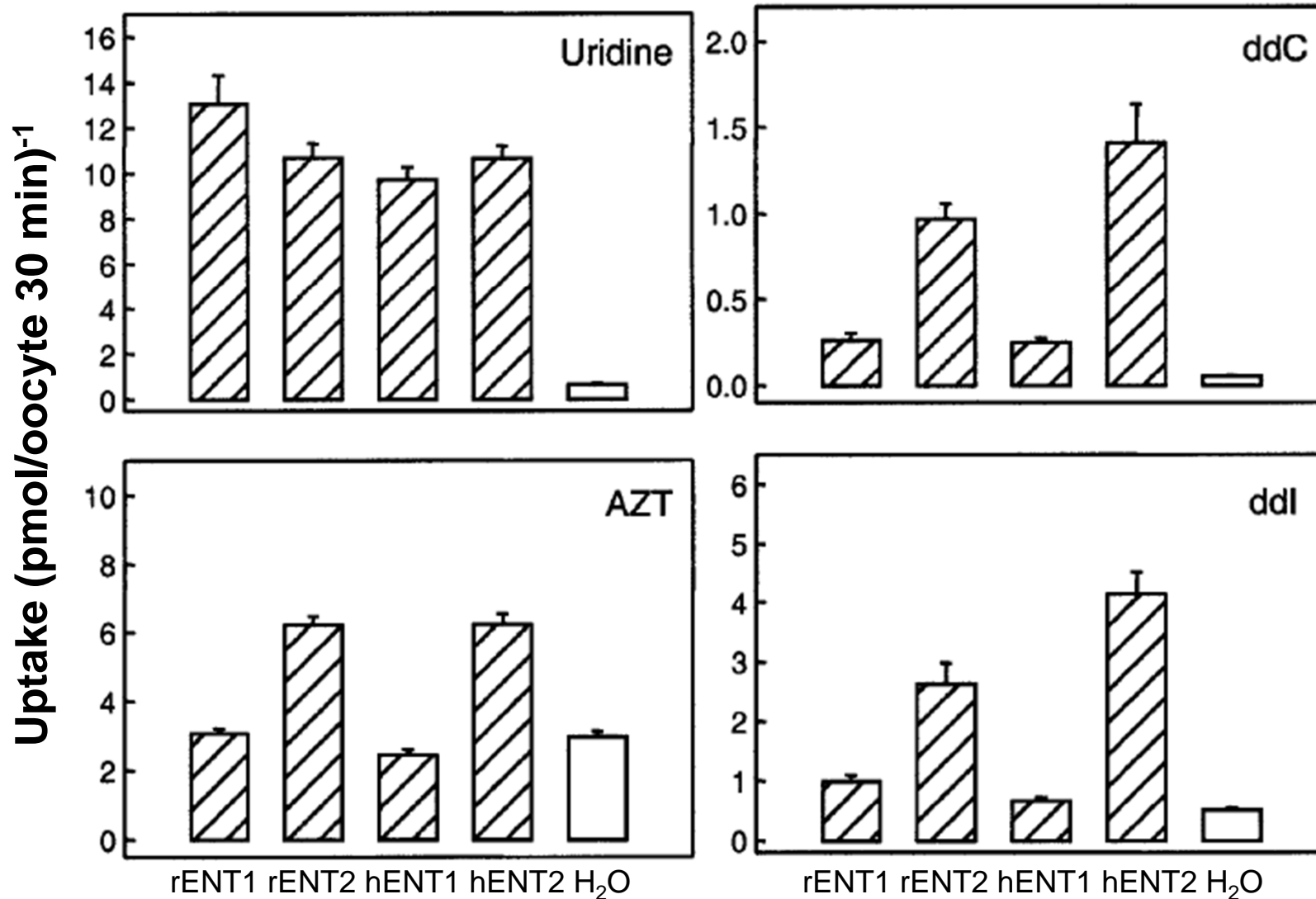
Uridine

ENT1の基質の方が透過性が高い



ラット胎盤由来TR-TBT 18d-1細胞への取り込み



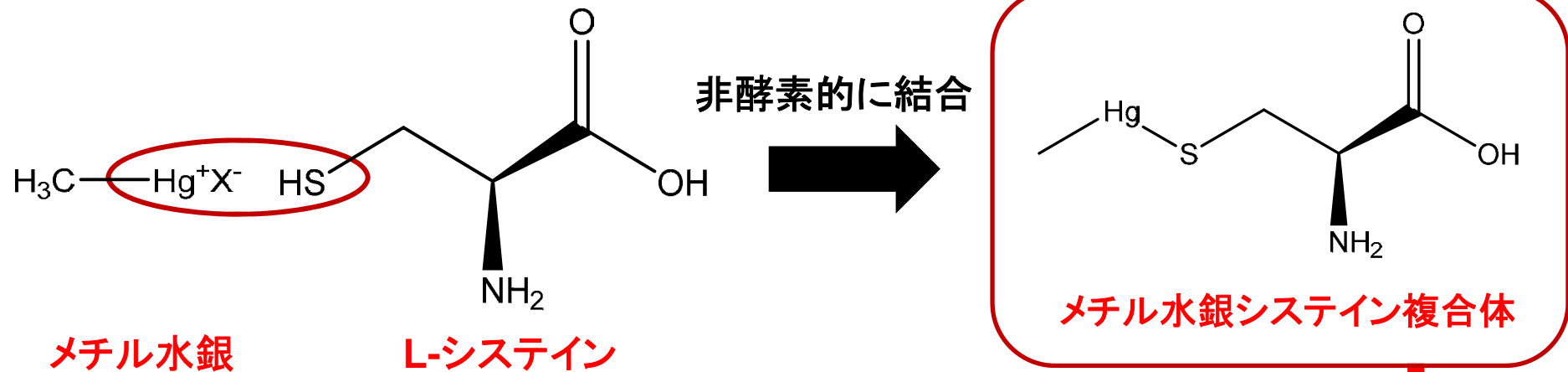


ヌクレオシド系化合物のENTへの基質認識性

胎盤メチル水銀透過機構

メチル水銀

- ✓ 胎児性水俣病の原因物質
- ✓ 胎児の神経形成を阻害



L-Type amino acid transporter (LAT)の基質



➤ LAT基質のrLAT1及びrLAT2に対する K_m 値

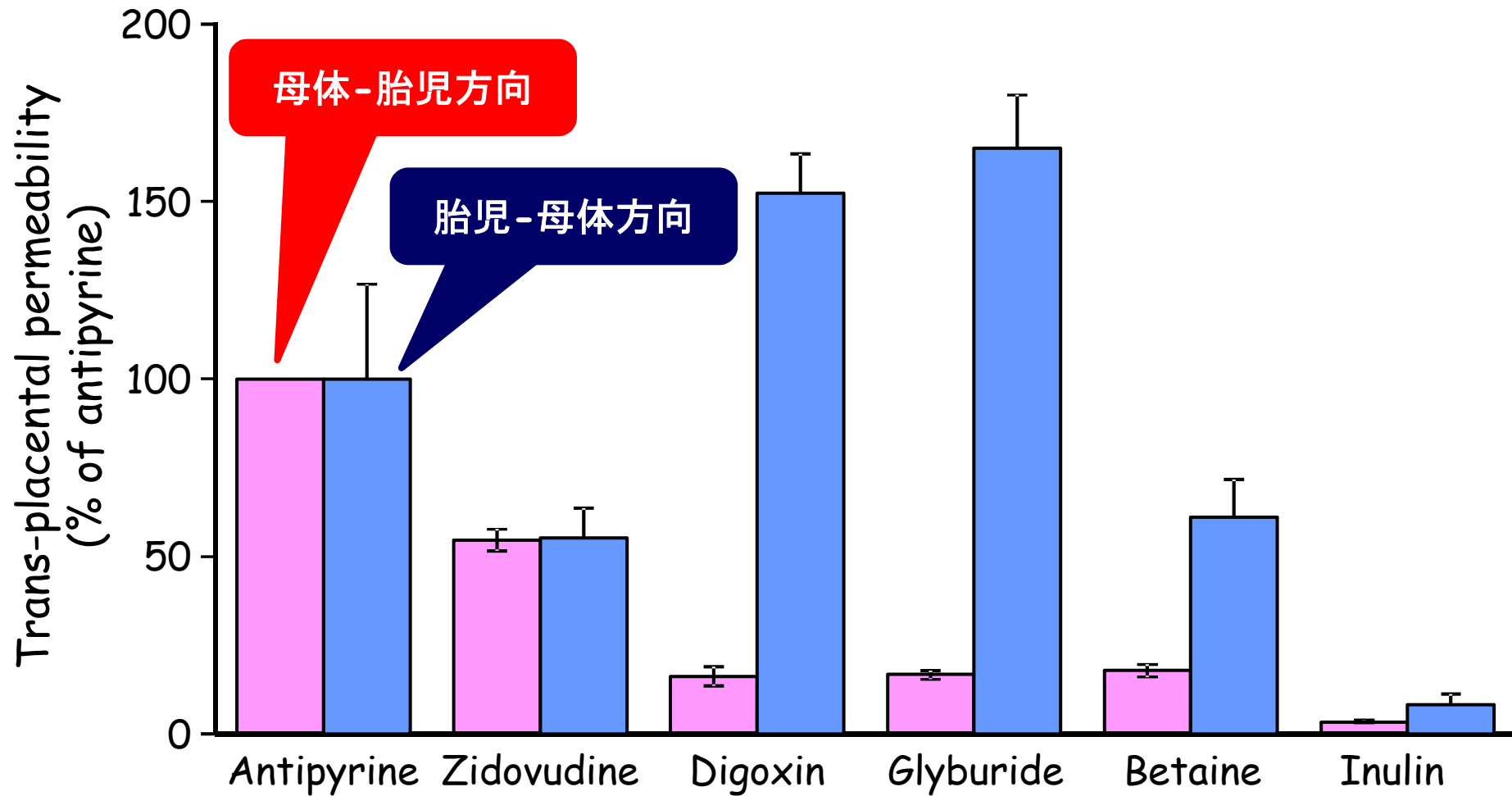
	rLAT1	rLAT2
L-ロイシン	18 ± 3 μM	119 ± 33 μM
メチル水銀複合体	98 ± 8 μM	64 ± 8 μM
L-システイン	—	109 μM

Kanai *et al.*, *J Biol Chem*, 273, 23629-23632 (1998).

Segawa *et al.*, *J Biol Chem*, 274, 19745-19751(1999).

Simmons-Willis *et al.*, *Biochem J*, 367, 239-246 (2002).

胎盤ベタイン透過機構

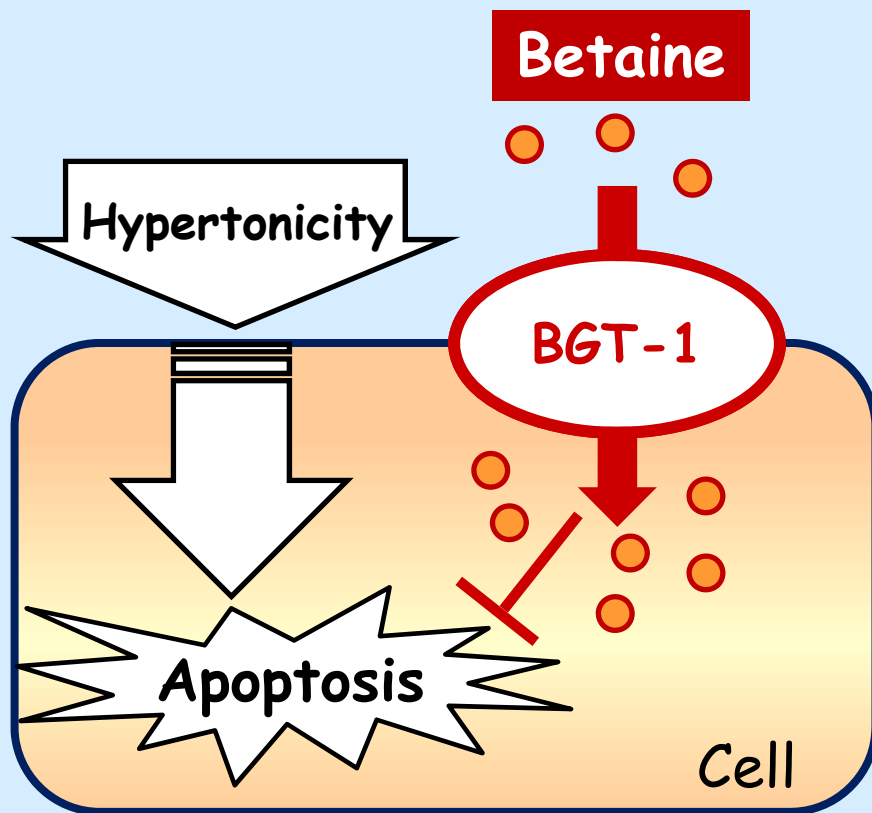
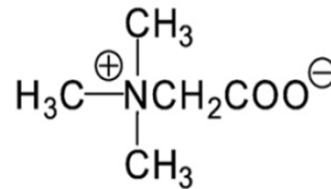


母体-胎児方向と胎児-母体方向の胎盤透過性の比較

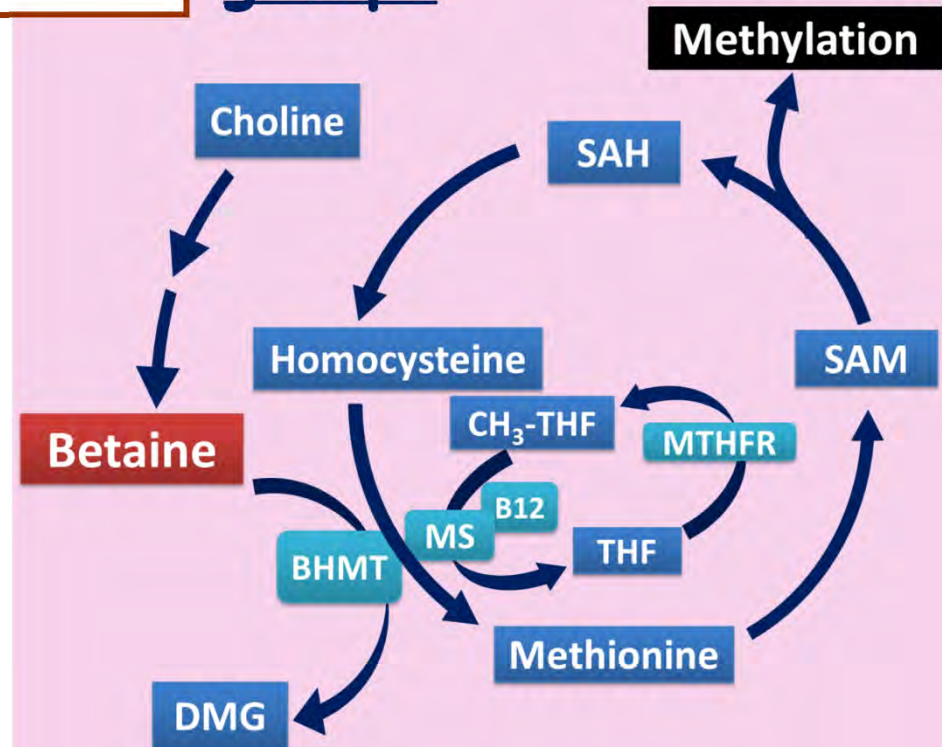
登美, *Drug Delivery System* 28(4) (2013).

Roles of betaine

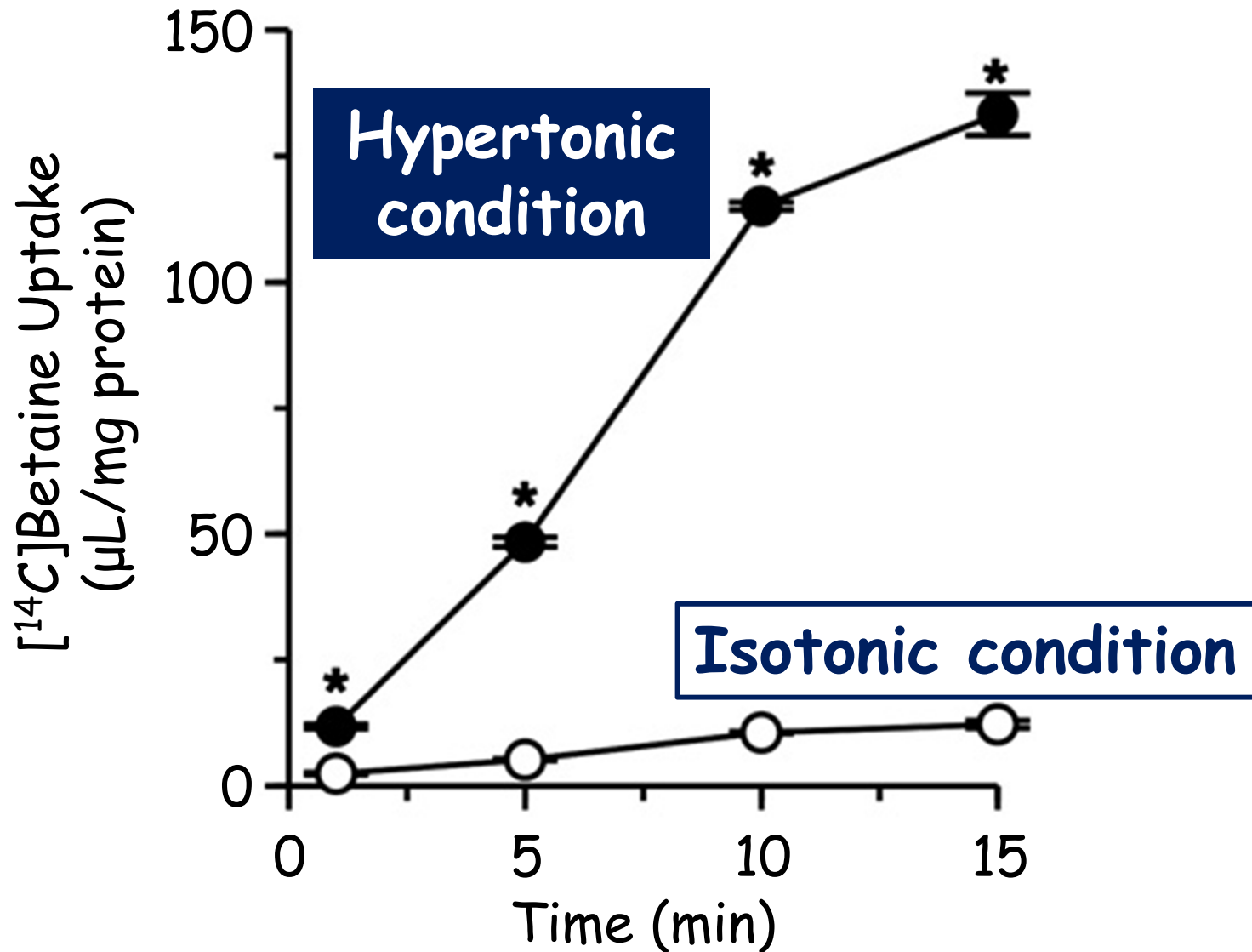
Osmotic regulation



Source of methyl groups



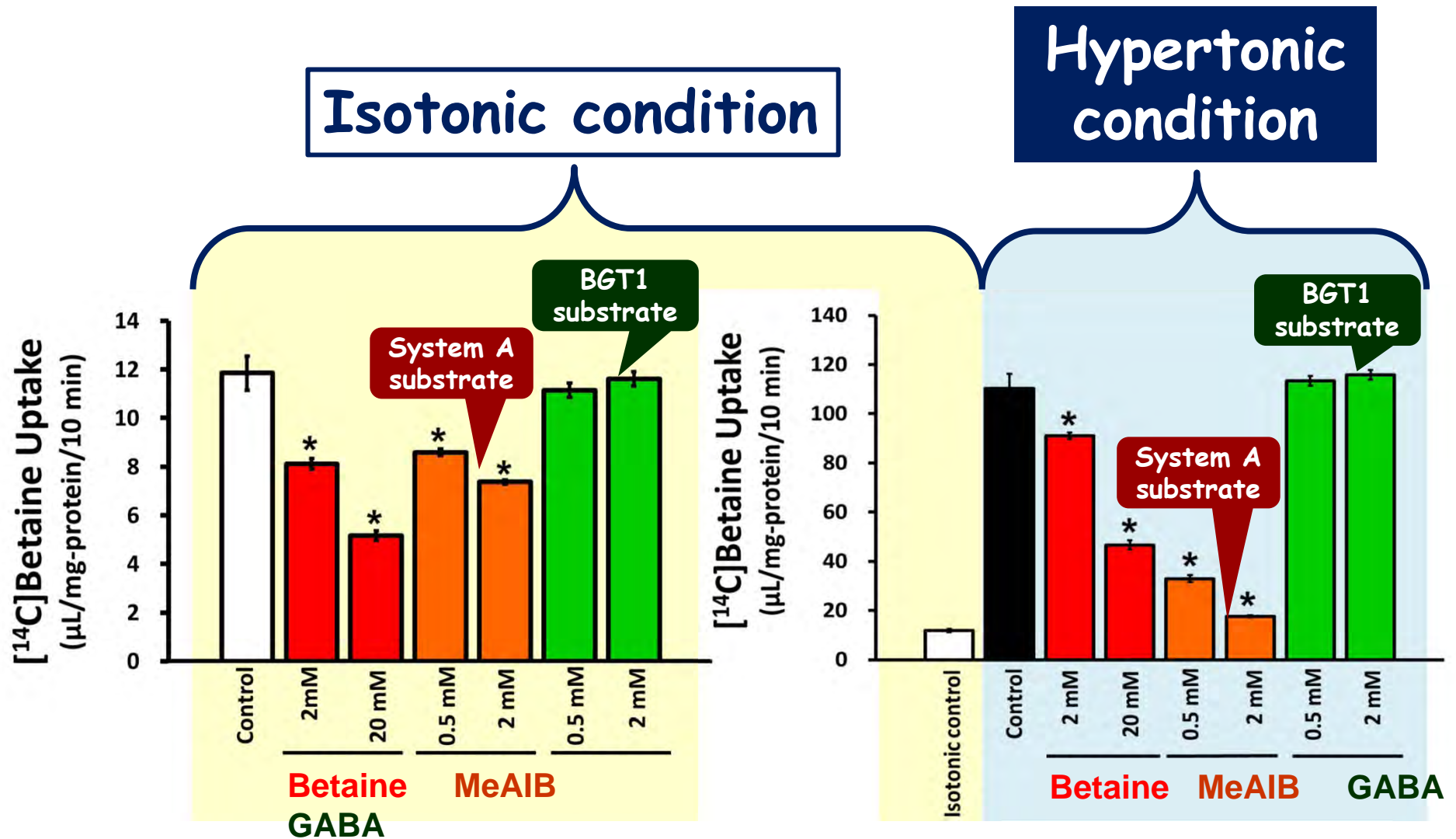
B12, vitamin B-12 (cobalamin); BHMT, betaine homocysteine methyltransferase; DMG, dimethylglycine; MS, methionine synthase; MTHFR, methylenetetrahydrofolate reductase; SAH, S-adenosylhomocysteine; SAM, S-Adenosyl-methionine; THF, tetrahydrofolate; CH₃-THF, 5-methyltetrahydrofolate.



Effect of osmotic stress on [¹⁴C]betaine uptake by the rat placental TR-TBT 18d-1 cell line

[¹⁴C]Betaine : 3 µM. Mean ± S.E.M. (n = 3-4). Uptake at 37°C in the presence of an inwardly directed Na⁺ gradient. 26
 A statistically significant difference is indicated by an asterisk * (p < 0.05).

Nishimura et al., *Placenta*: 1003-1009 (2010).



Effect of inhibitors on osmosensitive [¹⁴C]betaine uptake by the rat placental TR-TBT 18d-1 cell line

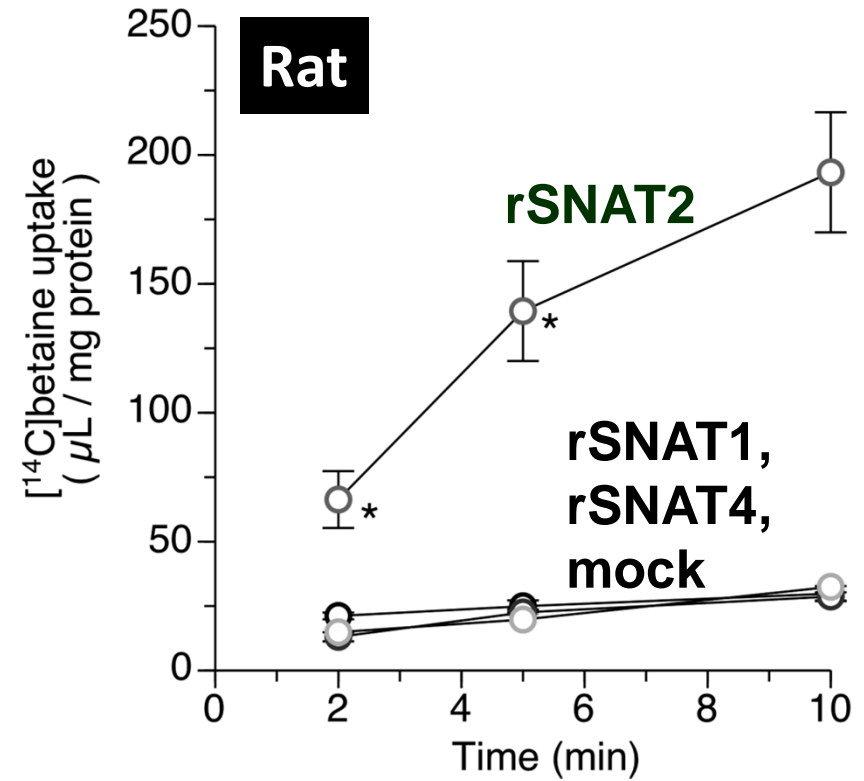
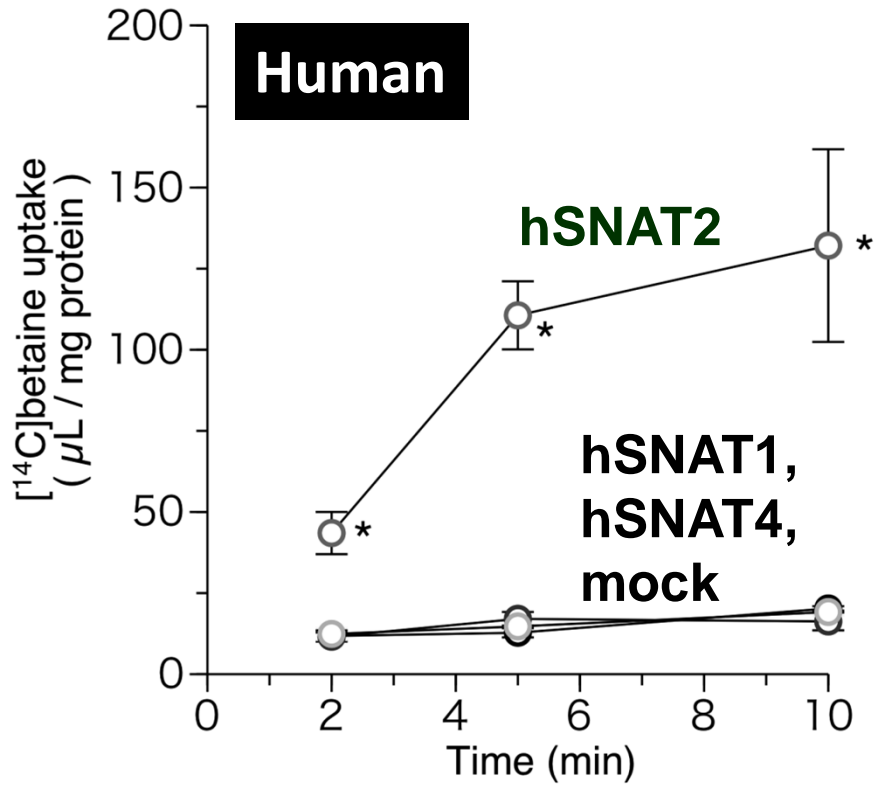
TR-TBT 18d-1 cells were cultured in isotonic (300mOsm/kg) or hypertonic (500mOsm/kg) medium . Uptake in the absence and presence of inhibitors. [¹⁴C]betaine : 3 μM. Mean ± S.E.M. (n = 3-4). *, p < 0.05 vs control.

Nishimura et al., *Placenta* : 1003-1009 (2010).

System A

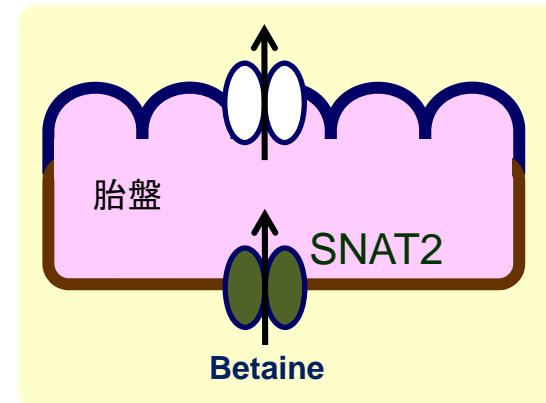
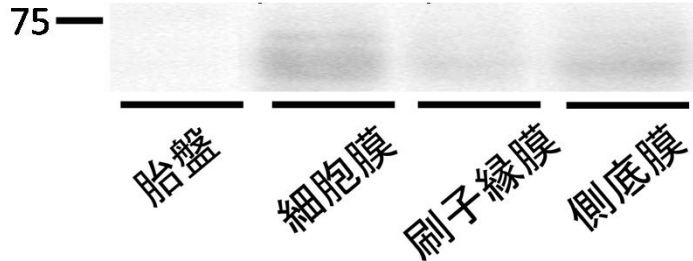
Protein name	SNAT1	SNAT2	SNAT4
Human gene name	SLC38A1	SLC38A2	SLC38A4
Former aliases	ATA1	ATA2	ATA3
Predominant substrates	Glutamine, Alanine Asparagine, Cysteine Histidine, Serine	Alanine, Asparagine Cysteine, Glutamine, Glycine, Histidine, Methionine Proline, Serine	Alanine, Asparagine, Cysteine, Glycine, Serine Threonine, Arginine, Lysine
Tissue distribution	Brain, Heart, Placenta	Widespread (including placenta)	Liver, Placenta
K_m value for MeAIB	0.89mM	0.39mM	6.7mM

MeAIB : methylaminoisobutyric acid



Human

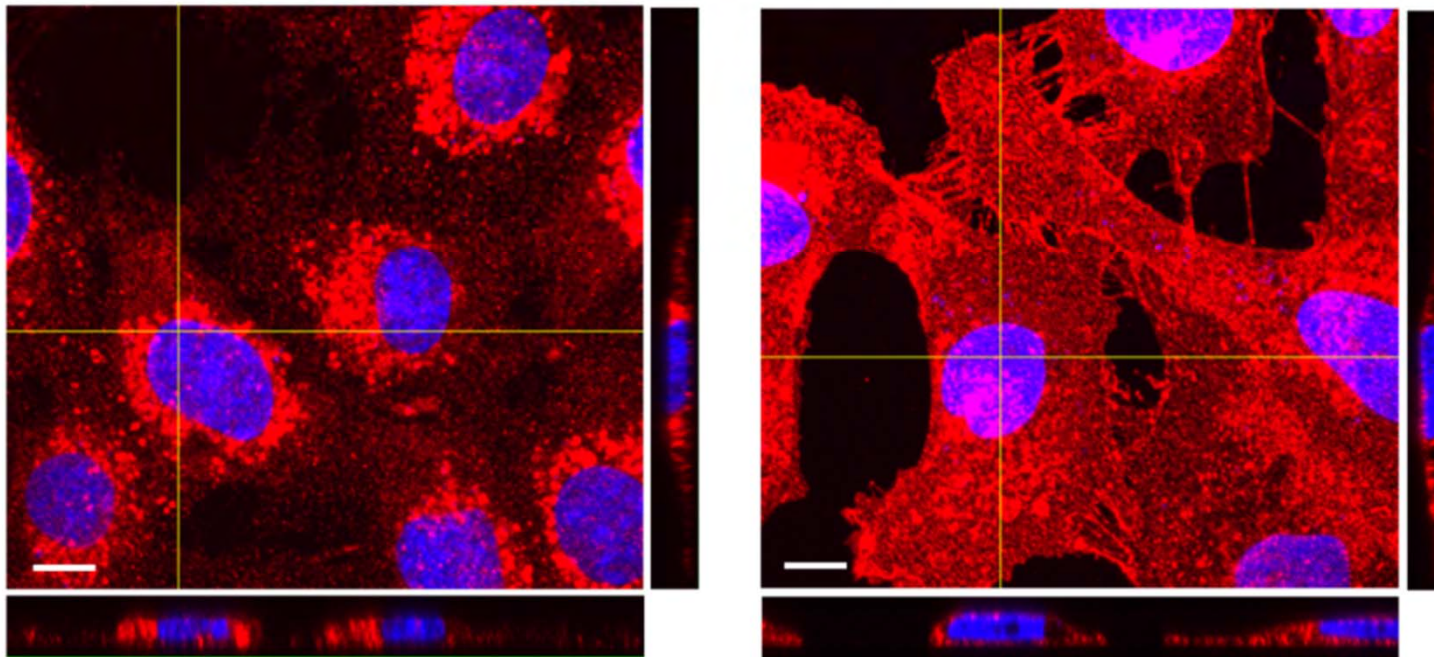
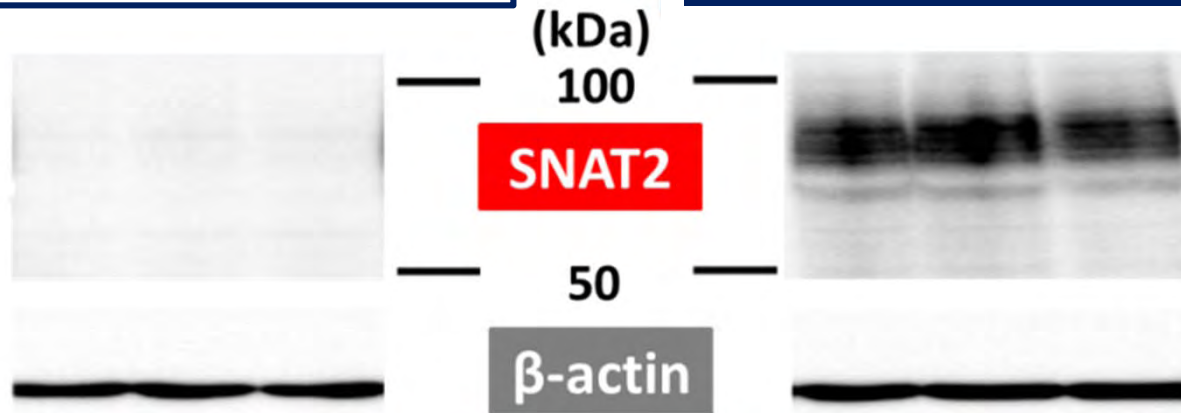
SNAT2/SLC38A2



SNAT2を介したベタイン輸送機構

Isotonic condition

Hypertonic condition



Western blot analysis : Protein was extracted from TR-TBT 18d-1 cells and expression of SNAT2 was analyzed by using an anti-SNAT2 antibody
Immunocytochemical analysis : Magnification x600. Bars=10 μ m.

Induction of SNAT2 protein by hypertonicity in TR-TBT 18d-1 cells

総括

基盤となる胎盤透過機構解析技術の確立

胎盤透過性評価技術や、母体側および胎児側細胞膜の精製技術、トランスポーター絶対発現量の解析技術など、新規の胎盤透過機構解析系を確立できた。これら評価技術は透過機構解明を加速させる上で有用性が高い。

研究戦略の合理性を裏付ける知見

基質選択性が低く、多くの化学物質の胎児移行に関与するABC排出トランスポーター活性における種差を示すことができたなど、胎盤透過性種差を評価するための重要な知見を得た。

未達成の課題

化学物質の胎盤関門透過機構における種差の解明は一部において達成できたが、化学物質の胎児移行性を予測可能な状態には達していない。

胎盤透過性における種差を機構論的に解明することは、ヒト胎児移行性の予測評価手法確立にむけた基盤データとして、食品健康影響評価に貢献できる。一方で、幅広い化学物質のヒト胎児移行性予測評価手法確立には、より長期的な研究が必要である。

1 発表論文

T. Nishimura, T. Takanohashi, M. Tomi, M. Horikoshi, K. Higuchi, Y. Sai, E. Nakashima: Evaluation of rat in vivo fetal-to-maternal transfer clearances of various xenobiotics by umbilical perfusion, *J. Pharm. Sci.*, 102:3356-63 (2013).

2 発表学会

- ✓ 日本薬物動態学会第26年会 (2011年11月, 広島)
- ✓ 第33回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (2011年11月, 岡山)
- ✓ Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2011 (Dec, 2011, Kuala Lumpur)
- ✓ International Symposium of Past, Present and Future of Molecular Pharmacokinetics (Jan, 2012, Tokyo)
- ✓ 日本薬学会第132年会 (2012年3月, 札幌)
- ✓ 日本薬剤学会第26年会 (2012年5月, 神戸)
- ✓ 第7回トランスポーター研究会 (2012年6月, 京都)
- ✓ International Federation of Placenta Associations Meeting 2012 (Sep, 2012, Hiroshima)
- ✓ 日本薬物動態学会第27回年会 (Sep, 2012, Hiroshima)
- ✓ 第34回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (2012年11月, 京都)
- ✓ 日本動物実験代替法学会第25回大会 (2012年12月, 東京)

3 受賞

第20回日本胎盤学会相馬賞

「Characterization of sodium dependent betaine uptake in human placental brush-border membranes」