

研究成果報告書（研究要旨）

研究課題名	胎児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（課題番号：1107）（研究期間：平成23年度～平成24年度）
主任研究者名	研究者名：登美 斉俊 所属機関：慶應義塾大学薬学部

化学物質暴露による胎児毒性の評価にはラットが汎用されている。しかし、ラット・ヒト間の胎盤関門透過性には種差が存在するため、ラットデータを用いたヒト胎児毒性予測の精度は低い。本研究では、胎盤透過性における種差を明らかにすることでヒト胎盤透過性予測手法を構築することを目的とした。まず、動脈内単回投与および血管灌流を用いた胎盤透過性評価手法を構築し、化学物質の胎盤透過性を評価した。その結果、化学物質の胎盤透過性は脂溶性の増加に伴って上昇する傾向が示された。ただし、いくつかの水溶性化学物質の胎盤透過性はトランスポーター介在性の胎盤透過機構の存在により非常に高く、一方、MDR1 や BCRP など ABC 排出トランスポーターの基質となる脂溶性化学物質の胎児移行性は非常に低かった。ABC 排出トランスポーターがビスフェノール A など基質の胎盤透過性に及ぼす影響は、ヒトと比較してラットにおいて大きい傾向が示され、これは胎児毒性の種差に影響する可能性がある。メチル水銀システイン抱合体とロイシンは共に胎盤関門刷子縁膜に発現する LAT トランスポーターの基質であるにもかかわらず、メチル水銀システイン抱合体の胎盤透過性はロイシンと比較して非常に低いことが示された。これは胎盤関門基底膜における透過機構の違いを反映している可能性がある。ベタインの胎児から母体方向の胎盤透過性は母体から胎児方向の透過性と比較して大きく、これは胎盤関門基底膜に発現する SNAT2 を介した胎児からの取り込み機構によって説明できる。さらに、胎盤刷子縁膜(母体側細胞膜) および基底膜(胎児側細胞膜) ベシクルを胎盤絨毛組織から精製し、各細胞膜におけるトランスポーターの発現量を定量した。ヒト胎盤関門には GLUT1, ENT1, MCT1, ASCT2, TauT, OATP2B1, OAT4, MDR1, MRP1, MRP4, BCRP といったトランスポーターが発現し、その中でも ASCT2, OATP2B1, OAT4, および MRP1 は主に基底膜に発現し、MDR1 および BCRP は主に刷子縁膜に発現していることが示された。以上の研究から、機能および分子レベルにおける胎盤透過性の評価技術手法を構築することができた。これら評価技術は化学物質の胎盤透過性における種差を理解する上で重要な役割を果たすことができる。

研究成果報告書（本体）

研究課題名	胎児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（課題番号：1107） （研究期間：平成23年度～平成24年度）
主任研究者	研究者名：登美 斉俊 所属機関：慶應義塾大学薬学部

I 研究の期間及び研究目標等

1 研究期間

平成23年度～平成24年度（2年間）

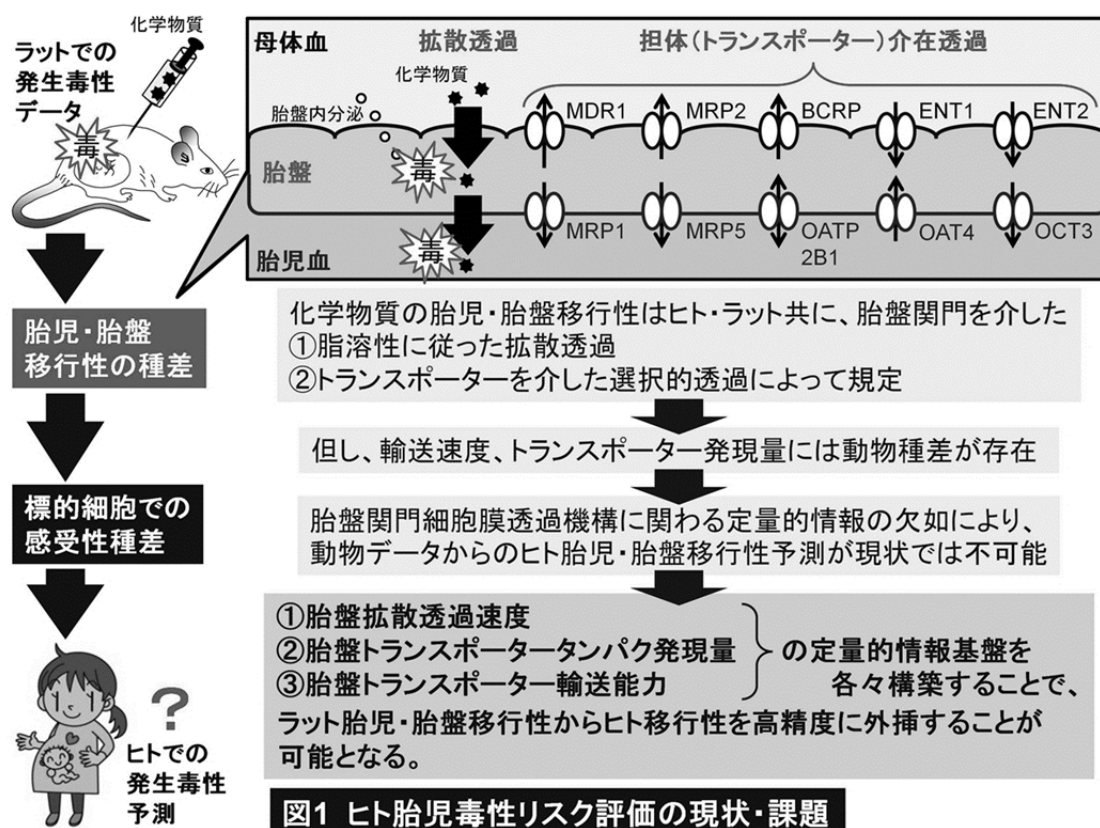
2 研究目的

化学物質暴露による胎児毒性の評価には疫学調査を除き、専ら実験妊娠動物が利用される。動物データをヒト胎児発生・胎盤毒性リスク評価に直接利用することは本来問題であり、現状では、種差を踏まえて化学物質の危険域は広く取らざるを得ない。本問題克服に向けたボトルネックは、動物データをヒトでのリスク評価に外挿する手法の欠如である。胎児毒性を決定する重大な要素として、化学物質の胎児・胎盤移行性が挙げられる。胎盤の構造機能には齧歯類・ヒト間で相違も多いが、化学物質の胎児・胎盤移行性が胎盤関門による制御を受ける点では一致する。胎盤関門細胞膜透過性は「①細胞膜脂質二重層への親和性（脂溶性）に基づく拡散透過機構」および「②母体側・胎児側細胞膜に極性局在するトランスポーターへの親和性に基づく選択的透過機構」によって決定される。そのため、これら要素の種差を解明することで、ラットでの移行性からヒトにおける胎児・胎盤移行性が外挿できる。そのため本研究では、胎児・胎盤移行性を規定する胎盤関門における種差を機能および分子レベルで解明し、実験動物での胎児毒性データをヒトに外挿する手法を開発することを目指す。具体的には胎児毒性が指摘されている化学物質のうち、アミノ酸トランスポーターによって胎盤関門透過性が促進されている可能性があるメチル水銀システイン抱合体や、排出トランスポーターによる胎盤関門透過性が抑制されている可能性があるビスフェノールA等に特に着目し、定量的データに基づくラットでの移行性からヒト移行性への外挿を行うことで、本手法の妥当性を評価することを目的とする。

本研究では、第一に「拡散移行」における種差を明らかにする。胎盤・胎児移行性のヒト/ラット比から、拡散移行に関するラットからヒトへの外挿を可能とする。第二に「トランスポーター発現量」における種差を解明する。分画した母体側および胎児側胎盤細胞膜におけるトランスポータータンパク分子数を絶対定量する。LC-MS/MSを用いた定量法により、高精度かつ高速に包括的評価ができる。胎盤移行性については母体側細胞膜でのト

ランスポーター発現分子数のヒト/ラット比を用い、胎児移行性については母体側・胎児側細胞膜両方での発現分子数比を用いる。第三に、「トランスポーター機能」における種差を解明する。ヒトおよびラット胎盤トランスポーターの強制発現細胞を構築し、細胞における基質輸送速度とトランスポータータンパク分子数をそれぞれ解析することによって、各トランスポーター1分子あたりの輸送活性を算出することができる。これら解析によってトランスポーター介在性透過も移行性予測に組み込むことが可能となり、高精度予測へのブレイクスルーとなる。

齧歯類での胎児移行性データに、拡散移行およびトランスポーター介在性移行の種差に関わる定量データを加味することで、ヒト胎児移行性データを精度高く予測可能かどうか、評価することが研究の到達目標である。さらに、ヒト胎盤における透過性・トランスポーター発現量情報を利用することで、化学物質の物性およびトランスポーター認識性に関する情報を用いたヒト胎盤移行性および胎児移行性の予測が可能となる。化学物質が胎児発生毒性を有する場合、本研究成果を利用して胎児・胎盤移行性を予測することで、毒性原因が胎盤内分泌機能によるものか、胎児発達にあるのかを動物実験なしに推定できるようになり、毒性発現メカニズムの迅速解明にも貢献できる。



3 研究体制

研究項目名	個別課題名	研究担当者名（所属機関名）
1) 胎盤拡散移行における種差の解明	①胎児胎盤移行性の評価	登美斉俊（慶應義塾大学）
	②介在トランスポーター分子の評価	登美斉俊（慶應義塾大学）
2) 胎盤トランスポーター発現量における種差の解明	①刷子縁膜・側底膜ベシクルの分画抽出・純度評価	丸山哲夫（慶應義塾大学）、 登美斉俊（慶應義塾大学）
	②刷子縁膜・側底膜におけるトランスポーター発現の絶対定量	登美斉俊（慶應義塾大学）、 丸山哲夫（慶應義塾大学）
3) 胎盤トランスポーター機能における種差の解明	①胎盤トランスポーター強制発現系の構築	登美斉俊（慶應義塾大学）
	②胎盤トランスポーター輸送活性の評価	登美斉俊（慶應義塾大学）

4 倫理面への配慮について

ヒト摘出胎盤組織を用いた研究は、慶應義塾大学薬学部および医学部倫理委員会の承認を受けて行った。具体的には組織利用に先立ち、提供者に研究内容等を説明し、自由意思による提供の同意を文書にて得た。また、試料を取り扱う際は、個人情報保護に配慮し、氏名ではなくコード番号を用いた。遺伝子組換え実験、放射標識化合物の利用、動物実験は各々慶應義塾大学薬学部遺伝子組換え DNA 実験安全委員会、慶應義塾大学薬学部放射線安全委員会、慶應義塾動物実験委員会の承認を受けてから行った。

II 研究内容及び成果等

1 研究内容及び方法

(1) 研究項目名：胎盤拡散透過における種差の解明

（研究担当者名：登美斉俊 所属機関名：慶應義塾大学）

1) 個別課題名：胎児胎盤移行性の評価

麻酔下妊娠ラット静脈あるいは摘出したヒト満期胎盤の母体血側にメチル水銀システイン抱合体、あるいはビスフェノール A 等の化学物質をアンチピリンと同時に投与し、一定時間経過後の胎盤および胎児血側への化学物質移行量を定量することで、胎盤・胎児移行速度を各々解析した。ラット、ヒトの移行速度を比較し、種差の有無を評価した。同時投与するアンチピリンはトランスポーター介在性輸送をほぼ無視できる化学物質であり、また胎盤胎児移行性評価の際のモデル物質として汎用されている。アンチピリンの透過性を指標にし、解析対象化学物質の胎盤・胎児移行におけるトランスポーターの関与を推定した。

2) 個別課題名：介在トランスポーター分子の評価

麻酔下妊娠ラット胎盤の母体血側に化学物質をトランスポーター基質の存在下で投与し、一定時間経過後の胎盤および胎児血側への化学物質移行量を定量した。トランスポーター基質による阻害効果を基準として、胎盤トランスポーターの関与の有無を評価した。

(2) 研究項目名：胎盤トランスポーター発現量における種差の解明

(研究担当者名：登美斉俊、丸山哲夫 所属機関名：慶應義塾大学)

1) 個別課題名：刷子縁膜・側底膜ベシクルの分画抽出・純度評価

ラットあるいはヒト胎盤ホモジネートから細胞膜画分を分画し、さらに刷子縁膜（母体側）タンパクおよび側底膜（胎児側）ベシクルを分画した。刷子縁膜ベシクルの純度評価は刷子縁膜のみが活性を有するアルカリフォスファターゼ活性を基準として評価した。側底膜ベシクルの純度評価は刷子縁膜に局在する β 受容体の遮断薬、ジヒドロアルプレノロール の結合活性を基準として評価した。

2) 個別課題名：刷子縁膜・側底膜におけるトランスポーター発現の絶対定量

分画抽出したタンパクをグアニジン塩酸で変性させ、還元アルキル化した後にプロテアーゼで消化し、ペプチドとした。トランスポータータンパク由来のペプチド数を LC-MS/MS を用いて定量した。測定ペプチドと同配列の安定同位体標識ペプチドを内部標準物質として用いることで、保持時間と質量値から対象ペプチドのシグナルを同定し、シグナル強度の比から試料中の対象ペプチドの絶対量を求めた。胎盤における主要なトランスポーター群について絶対定量を行い、胎盤刷子縁膜および側底膜における定量的トランスポーターアトラスを構築した。

(3) 研究項目名：胎盤トランスポーター機能における種差の解明

(研究担当者名：登美斉俊 所属機関名：慶應義塾大学)

1) 個別課題名：胎盤トランスポーター強制発現系の構築

胎盤での高発現が示されたヒトおよびラットトランスポーターをクローニングした。Flp-In 用トランスポーター発現ベクターおよび、Flp リコンビナーゼ発現ベクターを Flp リコンビナーゼ標的部位を有する Flp-In ホスト細胞に遺伝子導入した。これによって、Flp リコンビナーゼが一過性に発現し、ゲノム中の FRT 部位に発現ベクターが挿入される。挿入された細胞は薬剤耐性となり、トランスポーターの安定発現細胞を構築した。

2) 個別課題名：胎盤トランスポーター輸送活性の評価

構築した安定発現細胞を介した化学物質輸送の活性を評価し、胎盤トランスポーター機能における種差を速度論的に明らかにした。

2 研究成果、考察、今後の課題

(1) 研究項目名：胎盤拡散透過における種差の解明

(研究担当者名：登美斉俊 所属機関名：慶應義塾大学)

1) 個別課題名：胎児胎盤移行性の評価

母体・胎盤方向における胎盤透過クリアランスについて、分子量や脂溶性と透過性の関係の評価するため、様々な化学物質をアンチピリンとともに妊娠ラットの腹部大動脈下部に急速投与し、10秒後に子宮頸に最も近い側に位置する胎児を摘出し放射活性を測定した。同時投与するアンチピリンはトランスポーター介在性輸送をほぼ無視できる化学物質であり、また胎盤胎児移行性評価の際のモデル物質として汎用されている。アンチピリンの透過性を指標にして化学物質の胎盤・胎児移行におけるトランスポーターの関与を推定した。

図1に胎児移行性を、P値を分子量の平方根で補正したものに対してプロットした結果を示した。図1に示されているとおり、特にアンチピリンと比較して脂溶性の低い領域における胎児移行性においては、大まかにではあるが、P値を分子量の平方根で補正したものの値が大きいものほど高い胎盤透過クリアランスを示す傾向が得られた。一方で、脂溶性が低いにも関わらず胎盤透過性が高い物質も数多く見出された。これは、胎盤トランスポーター関与の有無によって胎盤透過性が大きく影響を受けることを示唆している。

解析した化合物のうち、イヌリンおよびマンニトールは水溶性の非透過性マーカーとして用いており、実際にその透過性もアンチピリンの3.3%および15%であった。これら非透過性マーカーの透過性と同程度であった水溶性物質としてメチル水銀システイン抱合体(7.0%)、パラアミノ馬尿酸(7.3%)、メトトレキサート(9.2%)、5-メチルテトラヒドロ葉酸(17%)、メチルアミノイソ酪酸(18%)、ベタイン(18%)、GABA(18%)が挙げられ、トランスポーターを介した胎盤透過は低く抑えられていると考えられる。一方で、セロトニン(27%)、アデノシン(28%)、タウリン(28%)、コリン(40%)、ロイシン(64%)、チミジン(67%)、ウリジン(67%)などは水溶性であるにもかかわらず透過性が高く、トランスポーターの関与が考えられる。メチル水銀は非抱合体では胎盤透過性が高いものの、実際は血中に存在するシステインと結合しており、メチル水銀システイン抱合体の胎盤透過性は、脂溶性と分子量から予測される胎盤透過性と比べて低い。胎盤に発現するトランスポーターであるLATはロイシンおよびメチル水銀システイン抱合体を共に基質とする。しかし、メチル水銀システイン抱合体の胎盤透過性はロイシンと比較して著しく低いことが示され、極めて興味深い(詳細は後述)。

脂溶性が中程度にあるヌクレオシド系化合物については、ジダノシン(ddI: 37%)およびザルシタビン(ddC: 34%)と比較してより脂溶性の高いジドブジン(AZT: 58%)の方が胎盤透過性も高いことが示された。さらに、この傾向はヒト胎盤透過性における結果と高い相関を示した(図2)。ただし、透過速度の絶対値においてはヒト満期胎盤の方が高いことが示されている。

アンチピリンと比較して脂溶性の高い領域における胎児移行性においては、MDR1やBCRPといった排出トランスポーターの基質ではないジアゼパム(73%)、フェニトイン(68%)、テオフィリン(91%)の胎盤透過性から示される通り、頭打ちとなる傾向が示された(図1)。一方、MDR1やBCRPは胎児側から母体側への排出を担うトランスポーターであるが、その典型的基質であるジゴキシン(16%)、グリベンクラミド(16%)、ミトキサントロン(7.7%)、ビンブラスチン(12%)の胎盤透過性は著しく低く、トランスポーターによる排出輸送が大きな役割を果たしていることが示唆された。ビスフェノールAについてもMDR1の基質であるとの報告はあり、その胎盤透過性はアンチピリン透過性の51%であり、比較的低いことが示された。MDR1やBCRPの基質であるグリベンクラミドやビスフェノールAのヒト胎盤透過性は、ラット胎盤透過性と比較して相対的に高く、MDR1やBCRPなど排出トランスポーターの影響はヒトにおいては低いことを示唆している。

胎盤移行性については、P値を分子量の平方根で補正したものと胎盤透過クリアランスとの間の明確な相関性が示されなかった(図3)。原因として、胎盤組織内血液中に投与した化学物質量が残存しているために、胎盤取り込みを反映していない可能性が挙げられる。

分子量や脂溶性と透過性の関係をより詳細に評価するため、胎児血管を化学物質を含む緩衝液で灌流し、胎児-胎盤方向における胎盤透過クリアランスを算出した(図4)。胎盤アンチピリンのラット胎盤透過クリアランスは180 $\mu\text{L}/\text{min}$ であり、ヒト胎盤透過クリアランスである330 $\mu\text{L}/\text{min}$ の55%であった。血管内灌流実験では灌流開始後15-30分を定常状態とし、15-30分における灌流液中の濃度から胎盤透過クリアランスを算出した。その結果、特にアンチピリンよりも脂溶性が低い薬物において、ロスバスタチンとベタインを除き、P値を分子量の平方根で補正したものの値が大きいものほど高い胎盤透過クリアランスを示す傾向が得られた(図4)。アンチピリンよりも脂溶性が高い薬物については、ベラパミル、キニジン、グリベンクラミド、ジゴキシンなどの排出トランスポーター基質において胎盤透過性が高い傾向が示された。MDR1やBCRPは胎児から胎盤方向の薬物輸送において決定的な役割を果たしていると考えられる。ベタインに関しては母体から胎児への移行性が低く(図1)、胎児から母体への移行性は高い(図4)。このことは胎児から母体方向への排出輸送系が化学物質の胎児移行を妨げていることをさらに裏付けている。

結論として、胎盤透過性をin vivoで評価する手法を確立し、多くの化合物について評価することができた。その結果、ヒト満期胎盤における拡散透過性はラットと比較して約2倍高いこと、また、MDR1やBCRPなど排出トランスポーターの影響はヒトにおいては低い可能性が示された。

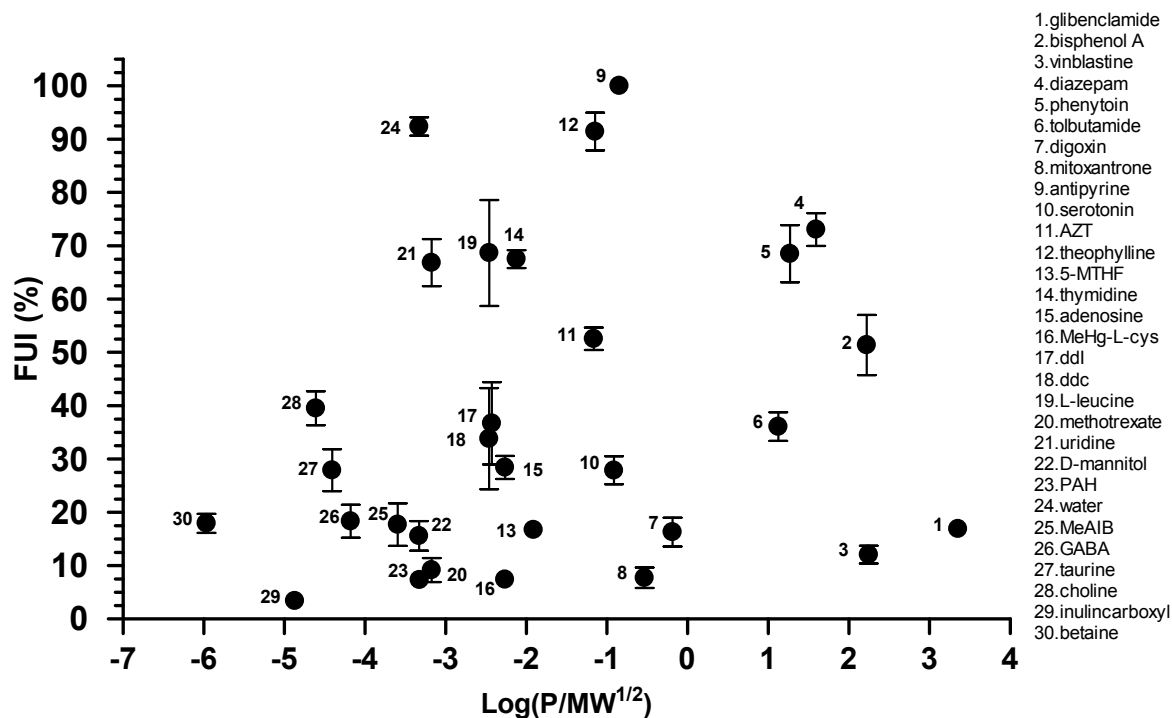


図1 脂溶性・分子量と母体からのラット胎児移行性(FUI)との相関

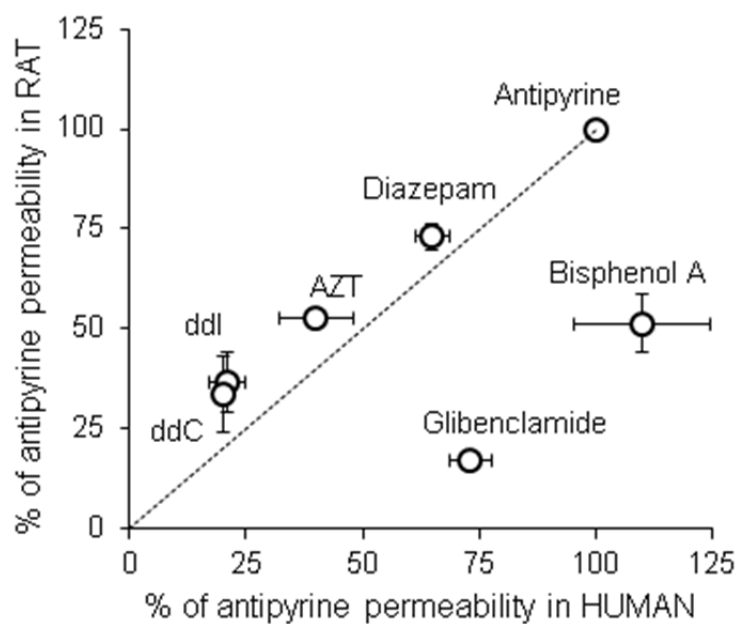


図2 胎盤透過性におけるヒト・ラット相関性

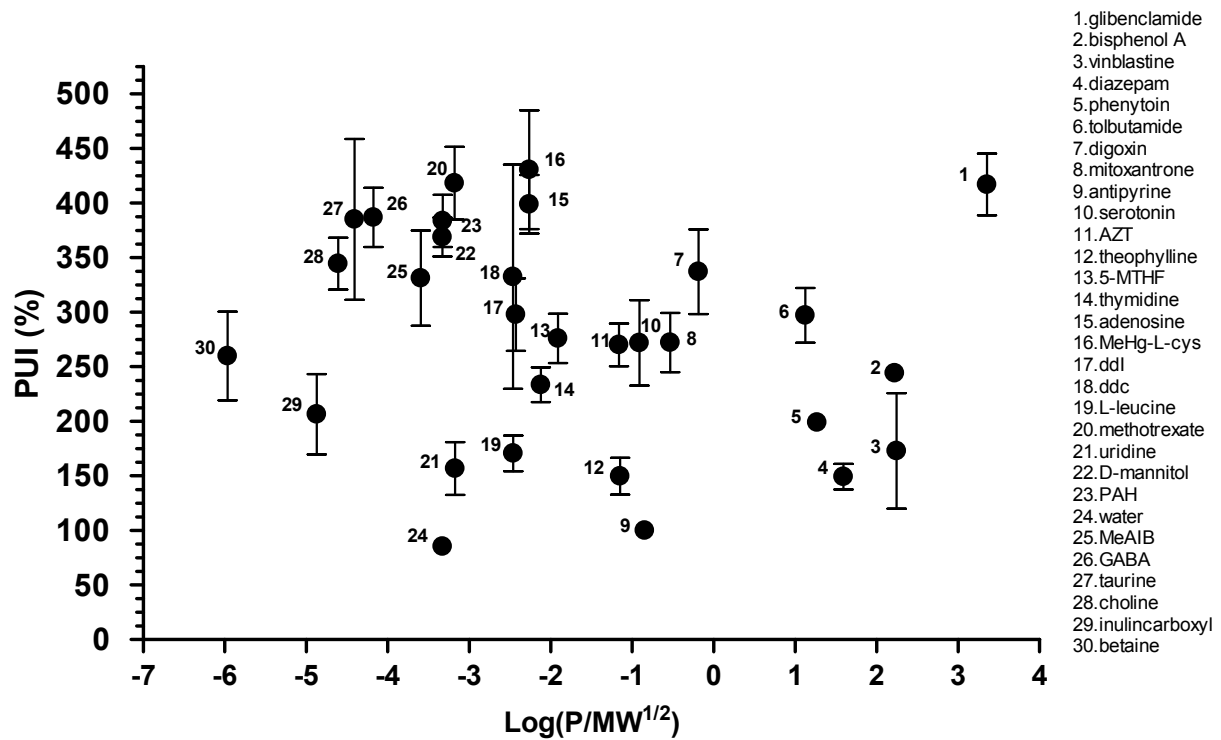


図3 脂溶性・分子量と母体からのラット胎盤移行性(PUI)との相関

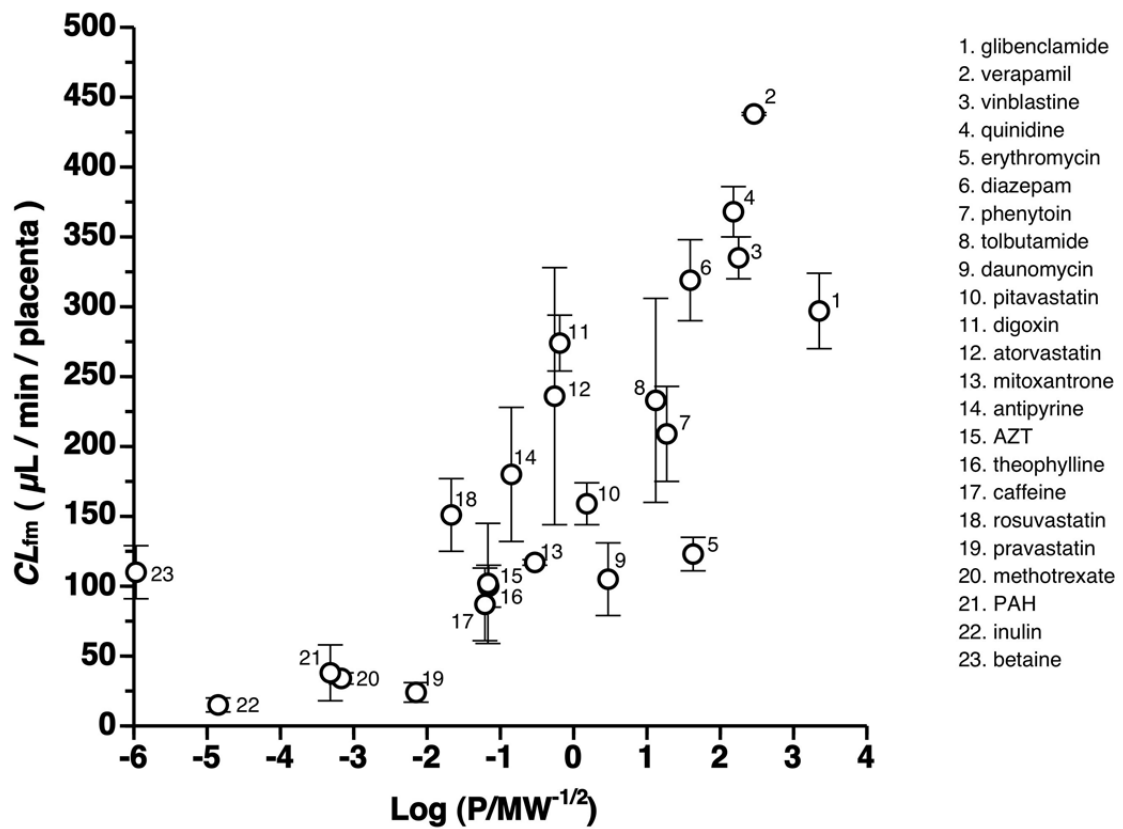


図4 脂溶性・分子量と胎児からのラット胎盤移行性との相関

2) 個別課題名：介在トランスポーター分子の評価

ロイシンと同様にLATの基質であるにも関わらず胎盤透過性が低いメチル水銀システイン抱合体、胎児母体方向へのベクトル輸送が示唆されたメチル基供与体であるベタイン、胎児におけるメチル基供与体として重要な役割を果たす葉酸の血中主要産物である5-メチルテトラヒドロ葉酸、ヌクレオシド系排出トランスポーターの影響によって胎児移行性が低いことが示唆されたジゴキシンおよびミトキサントロンについて、介在トランスポーターの同定を目指して解析を行った。

上述の通り、メチル水銀は非抱合体では胎盤透過性が高いものの、実際は血中に存在するシステインと結合しており、メチル水銀システイン抱合体の胎盤透過性は、脂溶性と分子量から予測される胎盤透過性と比べて低い(図1)。胎盤の母体側細胞膜に発現するLATはロイシンやメチル水銀システイン抱合体を基質とする。ロイシンの胎盤透過に及ぼす濃度依存性およびLAT選択的阻害剤である2-aminobicyclo-(2,2,1)-heptane-2-carboxylic acid (BCH)の影響を評価した結果、飽和性およびBCH感受性が示された(図5)。従って、胎盤にはLATを介した透過機構が存在し、ロイシンの胎児移行に関与することが示唆された。一方、メチル水銀システイン抱合体の胎児移行はロイシンの移行と比較して著しく低く、さらにBCHによる影響を受けないことが示された(図6)。メチル水銀システイン抱合体の細胞への取り込み機構について胎盤モデル細胞株であるTR-TBT細胞を用いて解析を行った結果、メチル水銀システイン抱合体の初期取り込み速度はロイシンと比較しても大きく、また、BCHで阻害されることが示された(図7)。これらの結果は、メチル水銀システイン抱合体とロイシンの母体から胎盤関門への取り込み機構には共にLATが関与する一方、胎盤関門から胎児への排出機構については、ロイシンには存在するもののメチル水銀システイン抱合体には存在しないことを示唆している。LATを介してメチル水銀システイン抱合体は胎盤に取り込まれるが、母体側細胞膜排出トランスポーターによる母体側に排出される、あるいは胎児側細胞膜におけるトランスポーターが存在しないために胎盤に蓄積する可能性が示唆された。

ベタインについてはTR-TBT細胞を用いて各種阻害剤の影響を解析した(図8)。その結果、ベタインの輸送は既知のベタイントランスポーター阻害剤であるGABAの影響を受けず、アミノ酸トランスポーターであるSNATの特異的阻害剤であるメチルアミノイソ酪酸によって強く阻害されることが示された。さらに、研究項目(2)で精製したヒト胎盤刷子縁膜ベシクルにおける輸送を評価した結果でも、取り込みはメチルアミノイソ酪酸によって有意に阻害され、SNAT2の関与がより示唆された。

ベタインと同様に胎児におけるメチル基供与体として重要な役割を果たす葉酸について、その血中主要産物である5-メチルテトラヒドロ葉酸の胎盤における輸送機構をヒト胎盤関門モデル細胞であるJEG-3細胞を用いて解析した。その結果、5-メチル

テトラヒドロ葉酸の輸送には担体介在性が示されたものの、既知のトランスポーターの阻害剤による阻害が示されなかった。

ヌクレオシド系化合物のうち、ジダノシンについては研究項目（2）で精製したラット胎盤刷毛縁膜ベシクルにおける輸送を評価した結果、取り込みはENTの阻害剤であるNBMPRで阻害され、ENTが輸送に関与することが示唆された。本性質は、ラット胎盤関門モデル細胞であるTR-TBT細胞における取り込み輸送においても同様であった。一方、TR-TBT細胞におけるジドブジンの輸送には担体介在性が示されたものの、既知のトランスポーターの阻害剤による阻害が示されなかった。

ジゴキシンについては、P糖タンパク質の基質であることが知られている。同じくP糖タンパク質の基質であるベラパミルの共存下において胎児母体方向の胎盤透過クリアランスが47 %低下していることが示された（図9）。本結果はP-糖タンパクが胎盤関門細胞から母体側への排出に関与していることをさらに裏付ける結果である。

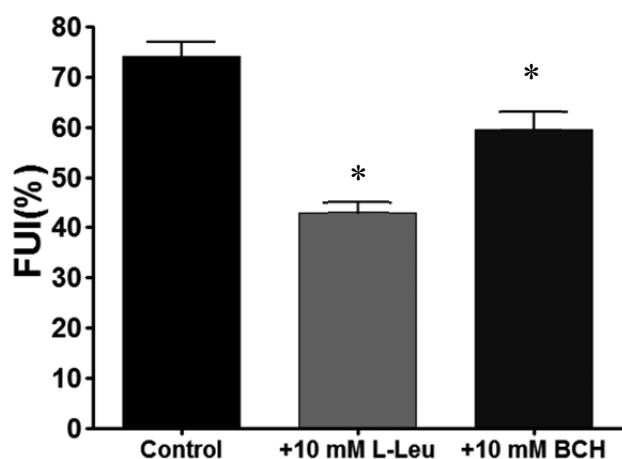


図5 ロイシンの胎児移行における飽和性およびLAT選択的阻害剤BCHの影響

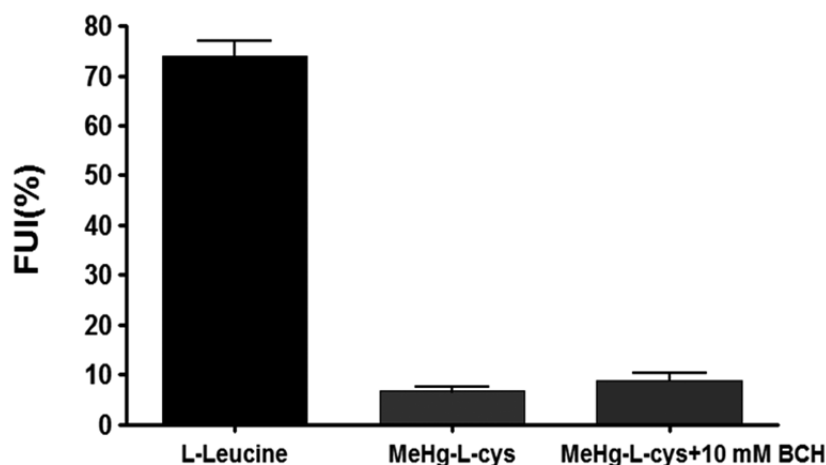


図6 メチル水銀システイン抱合体(MeHg-L-cys)胎児移行性のロイシンとの比較およびLAT選択的阻害剤BCHの影響

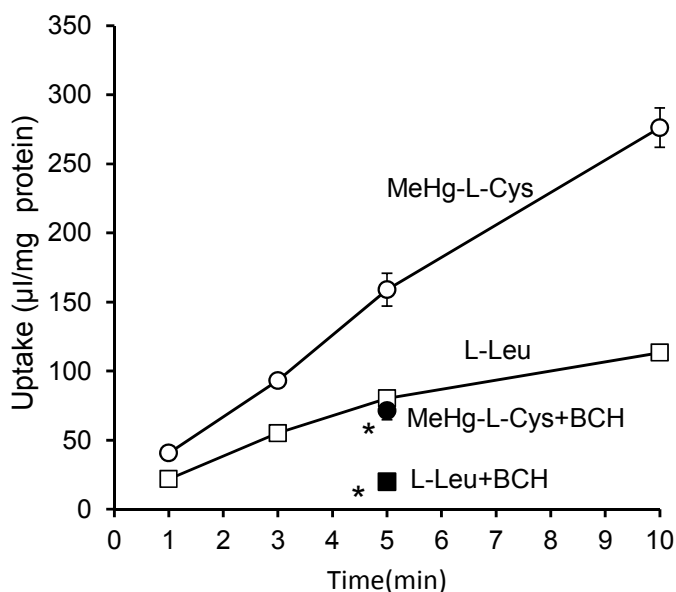


図7 胎盤モデルTR-TBT細胞におけるメチル水銀システイン抱合体およびロイシンの取り込みとBCHの影響

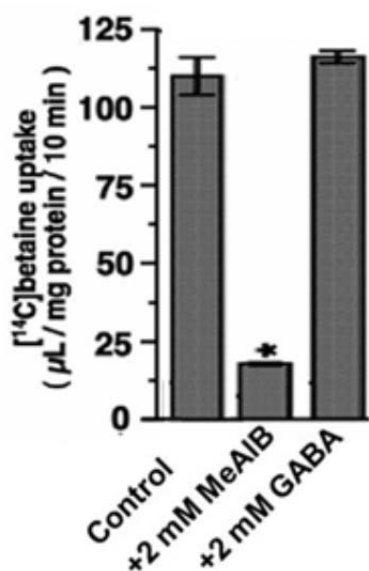


図8 胎盤モデルTR-TBT細胞におけるベタイン取り込みに及ぼす阻害剤の影響

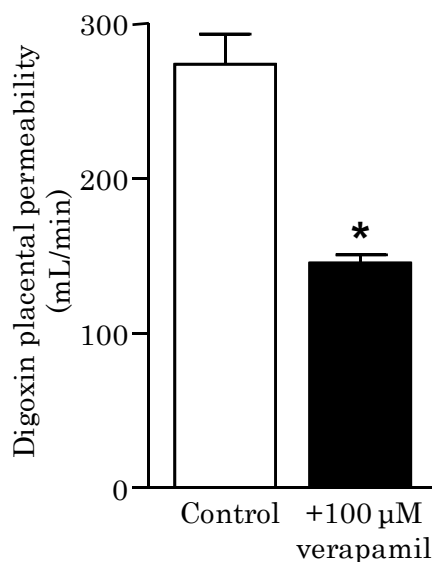


図9 ジゴキシンのラット胎児母体方向の胎盤透過に及ぼすベラパミルの影響

(2) 研究項目名：胎盤トランスporter発現量における種差の解明

(研究担当者名：登美斉俊、丸山哲夫 所属機関名：慶應義塾大学)

1) 個別課題名：刷子縁膜・側底膜ベシクルの分画抽出・純度評価

ラットおよびヒト胎盤ホモジネートから以下の手法で刷子縁膜ベシクルおよび側底膜ベシクルを分画した。

1. 単離胎盤絨毛組織をCa²⁺ Krebs-Henseleit buffer, 100 mM CaCl₂で洗浄する。
2. ミンスおよびホモジネートし、30分間incubationする。

3. 800gで遠心する。
4. 上清を再びホモジネートし、15分間incubationする。
5. 800gで遠心する。
6. 5の上清を110,000gで超遠心し、ペレットを25G針で懸濁し、刷子縁膜ベシクルとする。
7. 5のペレットを25G針で懸濁し、側底膜ベシクル粗画分とする。

刷子縁膜ベシクルの純度評価のため、刷子縁膜ベシクルのマーカーであるアルカリフォスファターゼ活性を測定し、胎盤ホモジネートおよび側底膜ベシクルと比較した（図10）。その結果、刷子縁膜ベシクルにおけるアルカリフォスファターゼ活性は胎盤ホモジネートと比較してラットで約9倍、ヒトで約30倍高いことが示され、側底膜ベシクルと比較しても著しく高いことが示された（図10）。側底膜ベシクル粗画分の純度評価のため、側底膜に局在する β 受容体の遮断薬、ジヒドロアルプレノロールの結合活性を測定し、胎盤ホモジネートおよび刷子縁膜ベシクルと比較した。その結果、ラットおよび側底膜ベシクル粗画分におけるジヒドロアルプレノロール結合活性は胎盤ホモジネートと比較して上昇しているものの、刷子縁膜ベシクルと同程度であった。そのため、側底膜ベシクルの純度を改善させるため、不連続密度勾配遠心による更なる精製を行った。ラット側底膜ベシクルをsucrose密度勾配遠心後の各密度フラクションにおけるジヒドロアルプレノロール結合活性を測定した結果、密度1.10 g/mLと1.15 g/mLの境界面にジヒドロアルプレノロール結合活性のピークが示された（図11）。密度勾配遠心による精製後の側底膜ベシクルにおけるジヒドロアルプレノロール結合

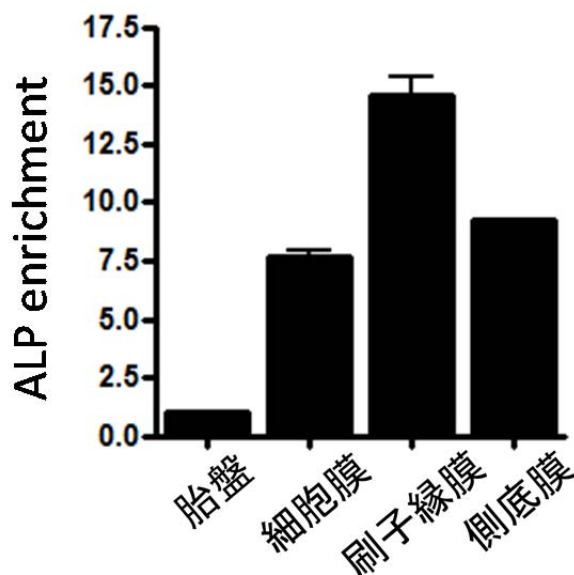


図10 ヒト胎盤膜ベシクルにおける刷子縁膜マーカー、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性の評価

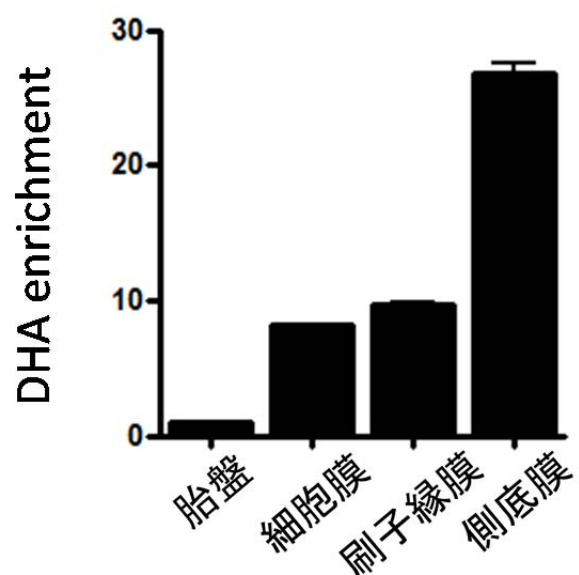


図12 ヒト胎盤膜ベシクルにおける側底膜マーカー、ジヒドロアルプレノロール (DHA) 結合活性の評価

活性は、胎盤ホモジネートや刷子縁膜ベシクルと比較して高く、側底膜ベシクルを精製できたことが示された（図12）。

以上の結果、胎盤組織からの刷子縁膜・側底膜ベシクルの分画抽出に成功したといえ、精製技術を確立することに成功した。

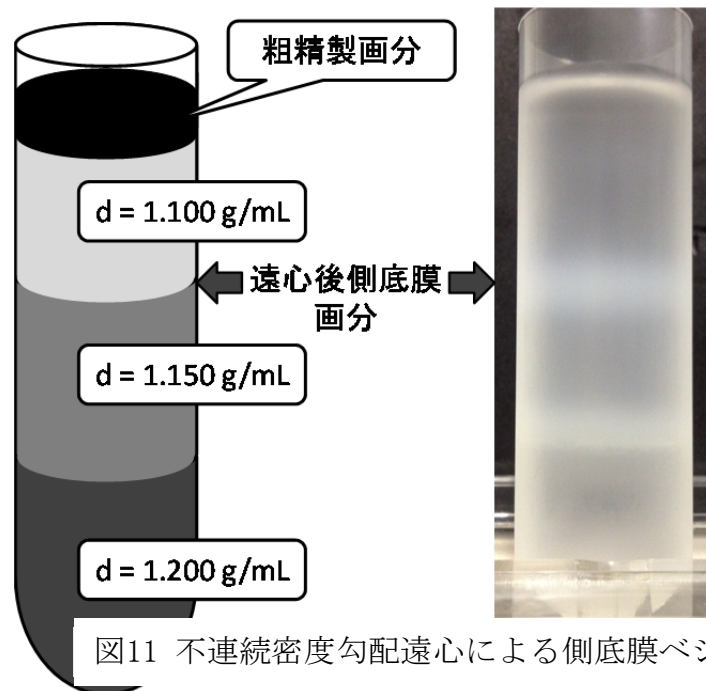


図11 不連続密度勾配遠心による側底膜ベシクルの精製

2) 個別課題名：刷子縁膜・側底膜におけるトランスポーター発現の絶対定量

刷子縁膜・側底膜ベシクルにおけるトランスポータータンパクの発現をまず解析するため、刷子縁膜選択的に発現することが報告されているトランスポーターABCB1/MDR1についてその発現量をWestern blotによって解析した。その結果、ヒト刷子縁膜ベシクルにおけるMDR1の発現量は胎盤ホモジネートおよび側底膜ベシクルと比較しても著しく高いことが示された(図13)。本結果はラットにおいても同様であった(図14)。一方、側底膜選択的に発現するOAT4およびASCT2の発現に関しては側底膜ベシクルにおいて最も高いことが示され(図13)、側底膜についてもトランスポータータンパク質の濃縮的な精製に成功していることが示された。ミトコンドリアマーカーであるcytochrome cは刷子縁膜・側底膜ベシクルいずれにおいても発現量が低下しており、効率的に除去できていることが示された。

ベタインの胎盤透過に関与している可能性のあるSNAT2については、側底膜ベシクルにおいてより高い発現が示され(図13)、胎児側からの取り込みへの関与がより大きいことが示唆された。本結果は、ベタインが胎児から母体方向にトランスポーターを介して積極的に輸送されている可能性が示された研究項目（1）での結果と相関している。

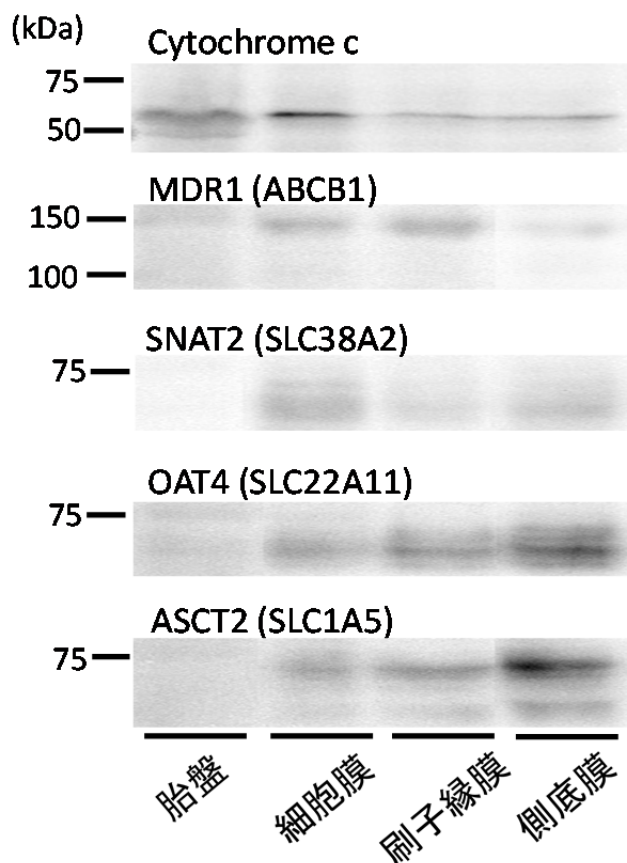
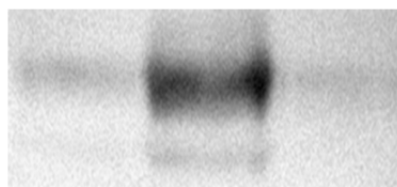
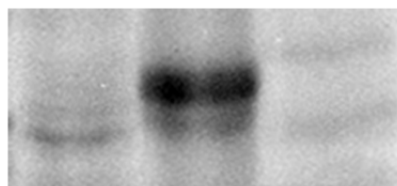


図13 Western blot法によるヒト胎盤膜ベシクルにおける刷子縁膜および側底膜マーカーのタンパク発現量の評価

P-glycoprotein



BCRP



胎盤全体 単離
刷子縁膜 刷子縁膜
(母体側) (胎児側)

図14 Western blot法によるラット胎盤膜ベシクルにおける刷子縁膜マーカー MDR1 (P-glycoprotein) およびBCRPの発現

35種のトランスポーターに対し、ヒト刷子縁膜・側底膜における発現分子数の絶対定量をLC-MS/MSを用いて行った。具体的には、分画抽出した刷子縁膜・側底膜ベシクルをグアニジン塩酸で変性させ、還元アルキル化した後にプロテアーゼで消化し、ペプチドとした。その後、トランスポータータンパク由来のペプチド数をLC-MS/MSを用いて定量した。測定ペプチドと同配列の安定同位体標識ペプチドを内部標準物質として用いることで、保持時間と質量値から対象ペプチドのシグナルを同定し、シグ

ナル強度の比から試料中の対象ペプチドの絶対量を求めた。絶対定量を行ったトランスポーターは次の35種である： 低分子水溶性栄養物質のトランスポーターとしてSLC1A5/ASCT2、SLC2A1/GLUT1、SLC6A6/TAUT、SLC6A12/BGT1、SLC6A13/GAT2、SLC16A1/MCT1、SLC38A1/SNAT1、SLC38A2/SNAT2、およびSLC38A4/SNAT4、有機アニオントランスポーターとしてSLCO1A2/OATP1A2、SLCO1B1/OATP1B1、SLCO1B3/OATP1B3、SLCO2B1/OATP2B1、SLC22A6/OAT1、SLC22A7/OAT2、SLC22A8/OAT3、およびSLC22A11/OAT4、有機カチオントランスポーターとしてSLC22A1/OCT1、SLC22A2/OCT2、SLC22A3/OCT3、およびSLC47A1/MATE1ヌクレオシドトランスポーターとしてSLC28A1/CNT1、SLC28A2/CNT2、SLC28A3/CNT3、SLC29A1/ENT1、SLC29A2/ENT2、およびSLC29A4/PMAT、排出トランスポーターとしてABCB1/MDR1、ABCC1/MRP1、ABCC2/MRP2、ABCC3/MRP3、ABCC4/MRP4、ABCC5/MRP5、ABCC6/MRP6、およびABCG2/BCRP。

SLCトランスポーターの定量結果は図15に示した。低分子水溶性栄養物質のトランスポーターとしてはグルコーストランスポーターGLUT1の発現量が刷子縁膜・側底膜の両方において圧倒的に高く、これは胎児において必要なグルコース供給のために高発現しているものと考えられる。乳酸トランスポーターであるMCT1についても刷子縁膜・側底膜の両方において発現が示され、胎児におけるエネルギー物質制御に重要な役割を果たしていると考えられる。ASCT2の発現量が特に側底膜において高いことも示されたが、ASCT2は胎盤関門の合胞化における胎児側細胞膜での受容体として機能することが示されており、その結果と一致する。ヌクレオシドトランスポーターであるENT1の発現量が非常に高かったことは、研究項目（1）においてアデノシン、チミジン、ウリジンが水溶性化合物であるにも関わらず胎盤透過性が非常に高いことと相関する。同様に、タウリントランスポーターであるTAUTの発現が示されており、これもタウリンの胎盤透過性が比較的高かったことと相関する。ベタイン輸送を担う可能性のあるSNAT2についてはWestern blotでは検出されたにもかかわらず、定量限界以下の値となった。

有機アニオン・カチオントランスポーターとしてはOATP2B1およびOAT4の発現が示された一方、その他のトランスポーターの発現は検出されていなかった。OATP2B1およびOAT4ともに発現が特に側底膜において高いことも示されたが、これは過去の報告と一致している。なお、今回の解析では検出されなかったトランスポーターには、過去の報告で免疫染色等による結果から発現が示されているものが存在する。上述の通り、発現量の低いトランスポーターについてはLC-MS/MSでは検出されないことがある。しかし、発現量から見た相対的重みづけ、つまり有機アニオントランスポーター群のうち胎盤において主要な役割を果たしているのはOATP2B1およびOAT4であることを明確にできた点において、今回の結果は非常に意義のある結果である。

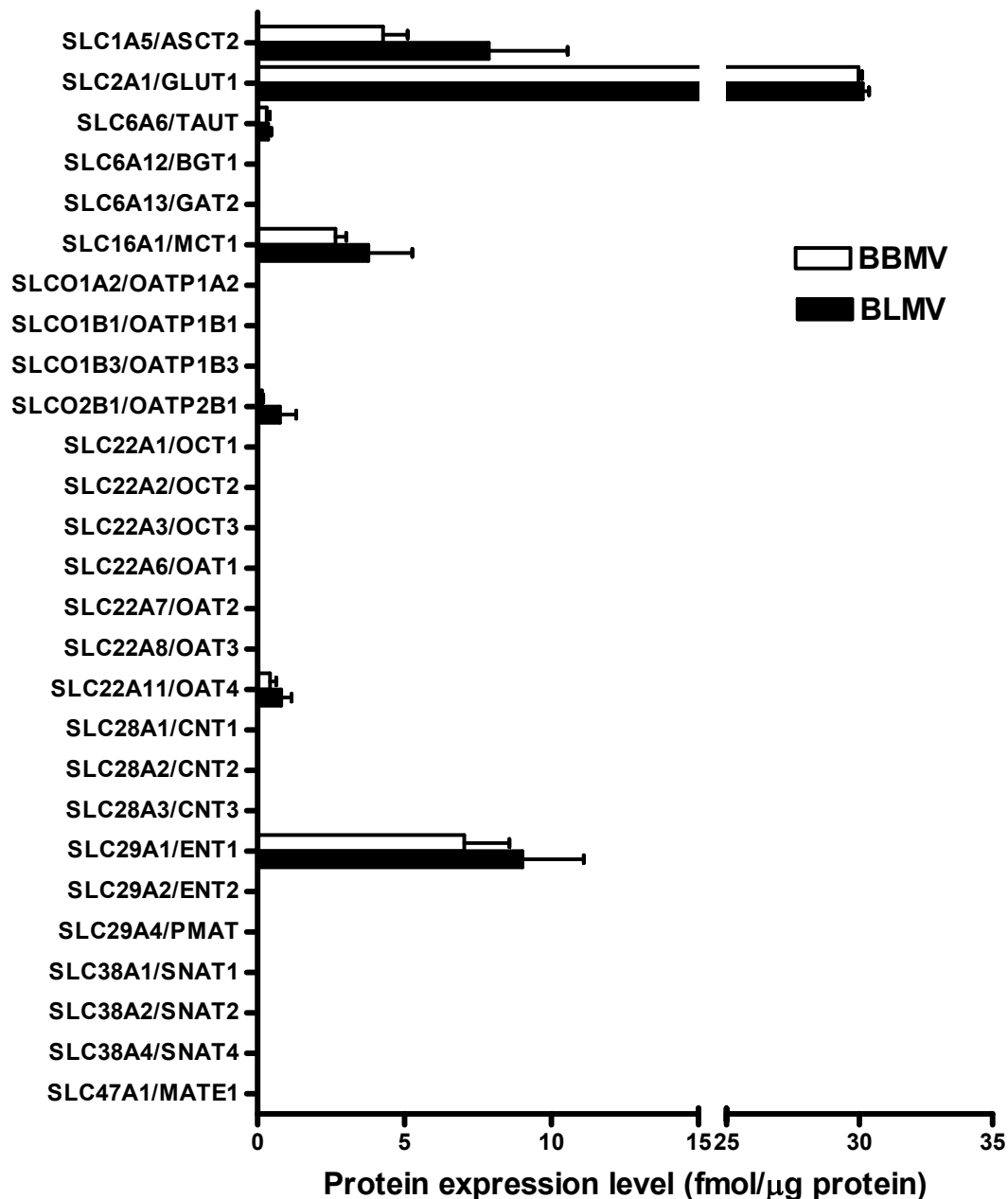


図15 LC-MS/MSを用いたヒト胎盤刷子縁膜 (BBMV) および側底膜 (BLMV) における SLC トランスポーター発現量の絶対定量

ABC トランスポーターの定量結果は図16に示した。MDR1およびBCRPの発現については刷子縁膜においてより高い傾向が示された。これは、研究項目（1）において MDR1およびBCRPの基質については胎児移行性が低い傾向が示されたことと一致する。MDR1およびBCRPの基質における低い胎児移行性についてはヒトよりもラットにおいて強く示されており、今後の課題としてはラットにおけるMDR1およびBCRP発現量の解析が必須である。一方、MRP1およびMRP4については側底膜側におけるより強い発現が示された。これは過去の報告では明確になっていなかった部分であり、その機能的役割についてさらに研究を進めていく必要がある。

過去の研究におけるタンパク発現解析は定量性に欠ける手法が多く、数多くのトランスporterのうちどのトランスporterが主要な役割を果たしているのかが不明であった。今回の研究において、主要トランスporterを絞り込めたことは、胎盤関門透過機構を理解する上で非常に重要な情報である。

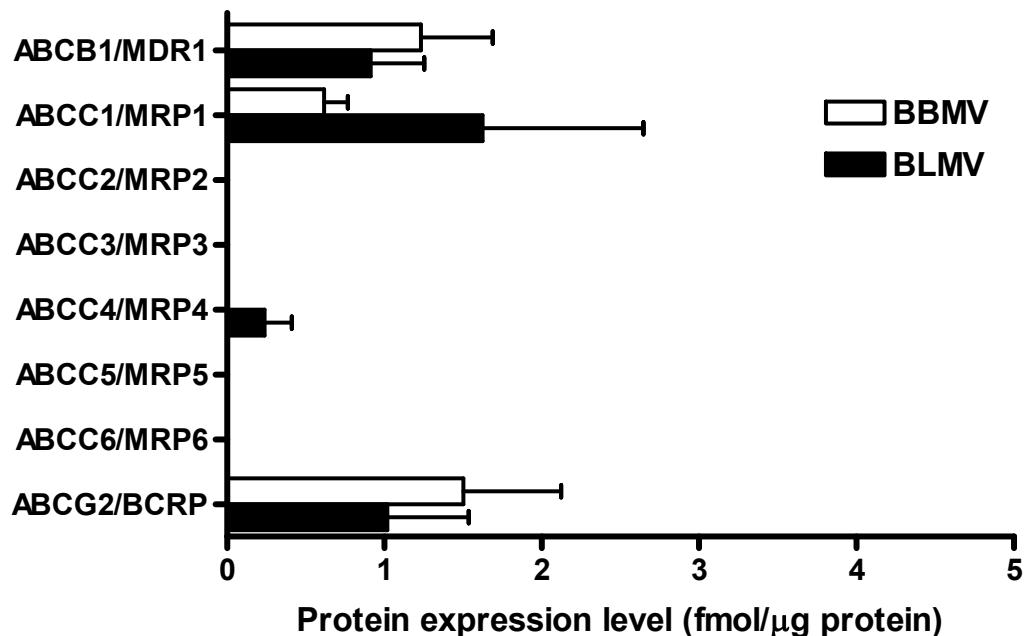


図16 LC-MS/MSを用いたヒト胎盤刷子縁膜 (BBMV) および側底膜 (BLMV) におけるABCトランスporter発現量の絶対定量

(3) 研究項目名：胎盤トランスporter機能における種差の解明

(研究担当者名：登美斉俊 所属機関名：慶應義塾大学)

1) 個別課題名：胎盤トランスporter強制発現系の構築

研究項目 (1) において、ベタインの胎盤透過にはアミノ酸トランスporterである SNAT が関与していることが示唆されたが、SNAT がベタインを輸送するとの報告はない。また、SNAT には SNAT1, 2, 4 の 3 つのサブタイプが報告されており、どのサブタイプがベタインを基質とするのか、不明である。そのため、ヒトおよびラット SNAT 強制発現細胞におけるベタイン輸送能を評価した (図 17)。その結果、SNAT のうち、SNAT2 発現細胞においてのみ、非発現細胞と比較して高いベタイン取り込み活性が示され、SNAT2 がベタインを基質とすることが示された。

そこで、pcDNA5/FRT/TO に組み込んだヒトおよびラット SNAT 2 発現ベクターと Flp リコンビナーゼ発現ベクター pOG4 を Flp-In™ T-REx™ 293 細胞に導入し、ハイグロマイシン B およびブラスチジンを含む medium で培養し、ハイグロマイシン B 耐性細胞を選択することで、テトラサイクリン依存的にトランスporterを発現する安定発現細胞株を構築した。

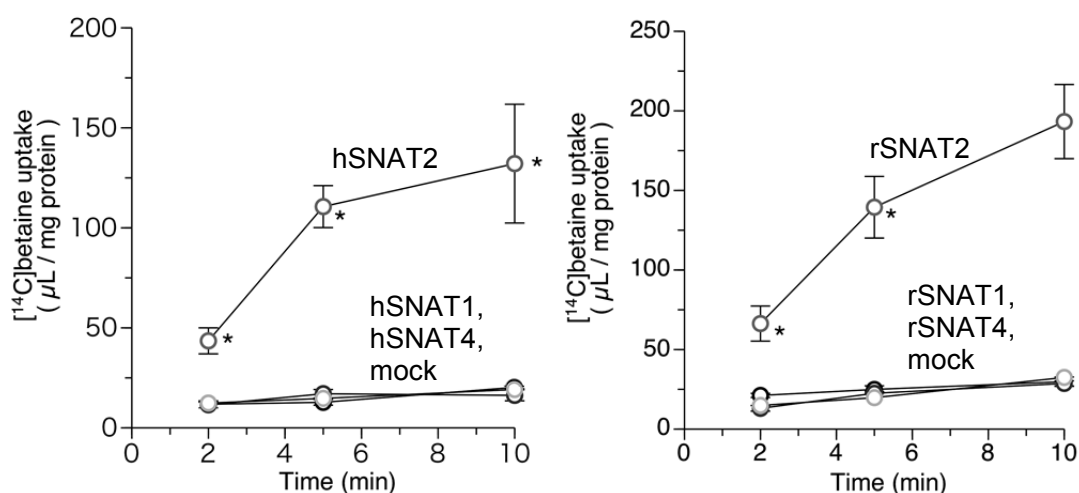


図17 ヒト(h)およびラット(r)SNAT強制発現細胞におけるベタイン取り込み活性の評価

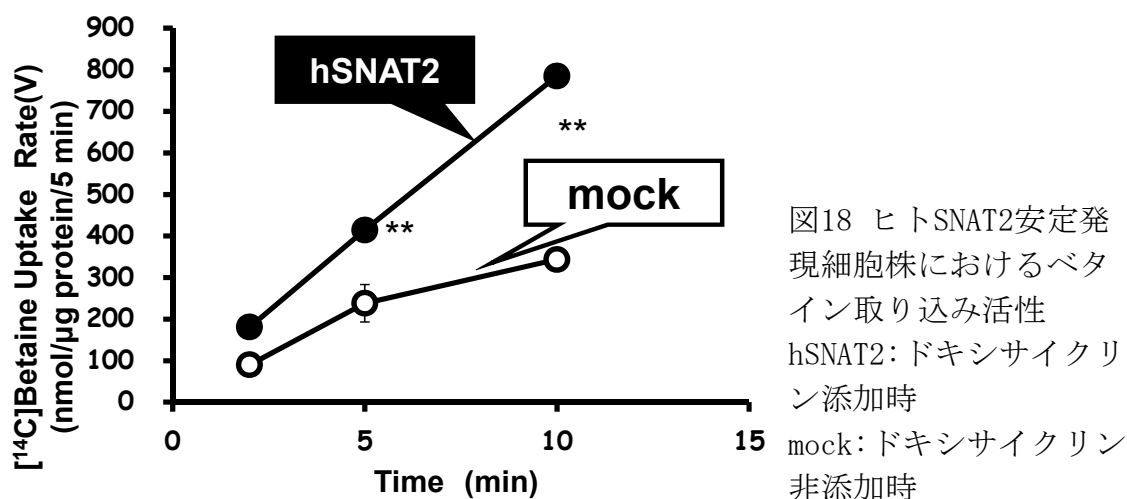


図18 ヒトSNAT2安定発現細胞株におけるベタイン取り込み活性
hSNAT2: ドキシサイクリン添加時
mock: ドキシサイクリン非添加時

選択した細胞クローンに対し、テトラサイクリン誘導体であるドキシサイクリンによる SNAT2 発現誘導を行い、ベタイン輸送活性をドキシサイクリン非添加時と比較した。その結果、ドキシサイクリン非添加時(mock)と比較してドキシサイクリン添加時ベタイン輸送活性の上昇が示され(図 18)、テトラサイクリン依存的に SNAT2 を発現する安定発現細胞株の構築に成功した。

2) 個別課題名：胎盤トランスポーター輸送活性の評価

ヒトおよびラットSNAT2発現細胞においてベタイン取り込みの速度論解析を行い、トランスポーター機能における種差を評価した。ヒトSNAT2発現細胞におけるベタイン取り込みのMichaelis-Menten定数(K_m) は5.3 mMであった(図19)。一方、ラットSNAT2発現細胞におけるベタイン取り込みの K_m は4.6 mMとなった(図20)。以上から、SNA

T2を介したベタイン取り込みの親和性はいずれも比較的低親和性であり、特にヒトにおいて低親和性であった。今後、発現細胞におけるSNAT2トランスポータータンパク発現量をLC-MS/MSを用いて定量することで、1細胞あたりSNAT2タンパク分子数を算出できる。トランスポーター1分子あたりの輸送活性を算出することにより、SNAT2機能における種差を定量的に明らかにすることができる。

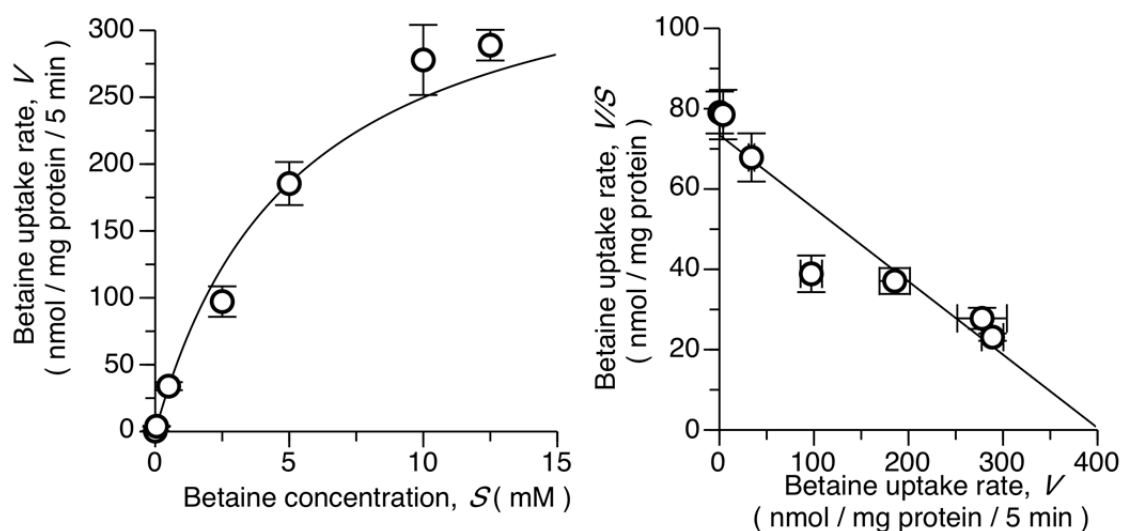


図19 ヒトSNAT2発現細胞におけるベタイン取り込みの濃度依存性

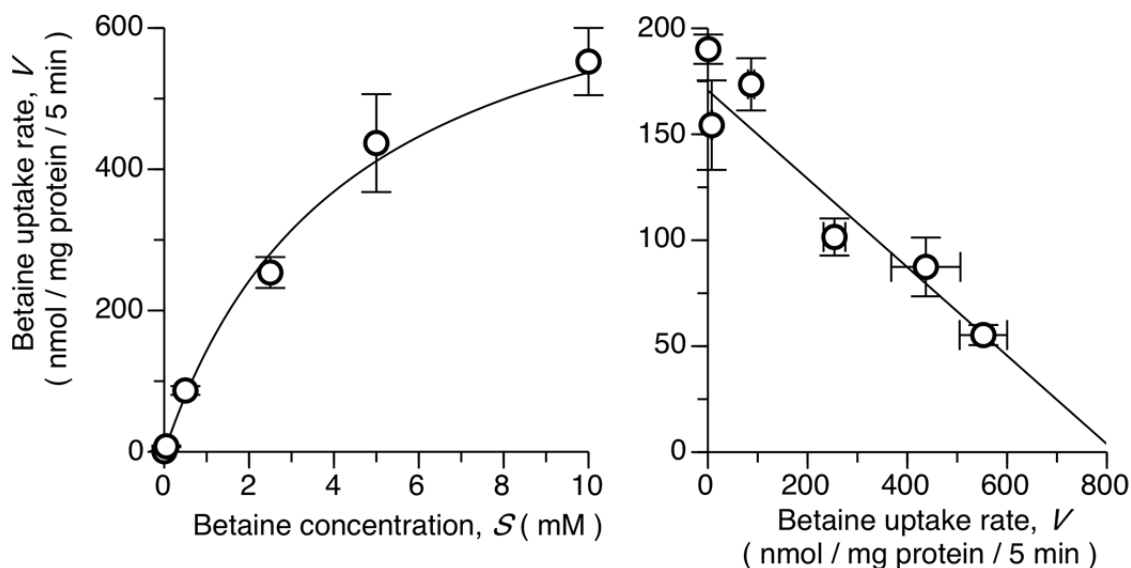


図20 ラットSNAT2発現細胞におけるベタイン取り込みの濃度依存性

(4) 研究全体の成果、考察及び結論

過去の研究においてヒト満期胎盤を用いた胎盤透過性解析の報告はあるものの、ラット胎盤透過性に関して着目した研究はほとんど存在しない。しかし、化学物質

暴露による胎児毒性の評価には疫学調査を除き、主にラットが利用される。ラットデータをヒトでのリスク評価に外挿するためには、ラット・ヒト両方において胎盤透過性に関する情報を収集することが必要であった。本研究において、ラットにおける胎盤透過性解析手法について、母体からの透過性および胎児からの透過性の両方を解析することが可能となった。これにより、ヌクレオシド系化合物において示されたように、脂溶性が高いほど透過性が高いという傾向はヒトとラットの間で共通することが示された。一方、ヒト満期胎盤における絶対的な拡散透過性はラットと比較して高いことも示唆された。したがって、化学物質の胎児移行性は少なくとも妊娠末期の妊婦においてより高い可能性があり、ラットでの毒性データをヒトに外挿した際の毒性リスクを過小評価する一因となる。

MDR1やBCRPといった排出トランスポーターが胎盤透過性に与える影響はヒトと比較してラットにおいてより大きいことが示唆された。原因として、排出トランスポーターの発現量種差の他、ヒト胎盤における拡散透過性の高さが排出トランスポーターの寄与を相対的に小さくしている可能性が挙げられる。胎盤におけるMDR1やBCRPの機能種差を示唆するデータはこれまでになく、化学物質の胎児移行を予測する上で有用な情報である。今後は、絶対発現量解析技術を用いて、トランスポーター発現量種差を明らかにする必要がある。ビスフェノールAなど、MDR1やBCRP基質となる化学物質のラットにおける透過性はより低いため、MDR1やBCRPの影響を踏まえずに毒性データをヒトに外挿した場合にはその毒性リスクを過小評価する可能性がある。

メチル水銀システイン抱合体透過には胎盤の刷子縁膜に発現するLATの関与が考えられる。LATの内因性基質であるロイシンはLATを介した非常に高い胎盤透過性が示されたのに対し、メチル水銀システイン抱合体の胎盤透過性は非常に低いことが示された。これは、母体側である刷子縁膜の取り込み機構が同じでも胎児側である側底膜での排出機構が異なることで透過性が大きく変わることを示唆するものである。今後はメチル水銀システイン抱合体透過の側底膜での排出機構におけるロイシンとの違いを明らかにする必要がある。メチル水銀システイン抱合体に限らずあらゆる化合物において、刷子縁膜での取り込みトランスポーターばかりに着目するのではなく側底膜での排出機構も含めた透過メカニズムの解明が必須であり、トランスポーター発現量情報を刷子縁膜と側底膜に分けて行う本研究の意義も大きいものと考えられる。

ベタインの透過性は母体胎児方向に比較して胎児母体方向において高いことが示された。機能解析の結果からSNATファミリーのベタイン輸送への関与が示唆され、さらにSNAT1,2,4発現細胞における結果からベタインを基質とするのはSNAT2のみであることが示された。胎盤刷子縁膜と側底膜におけるWestern blotの結果から、SNAT2の発現が胎児側である側底膜においてより高いことが示され、SNAT2を介した

胎児から母体方向へのbetaine輸送機構の存在がより強く示唆された。本結果は、本研究において達成した胎盤透過性解析技術および胎盤トランスポーター発現量解析技術と、トランスポーター機能解析技術を組み合わせて明らかになったものであり、本研究手法の妥当性を一部裏付けている。今後、SNAT2発現量における種差を明らかにすることで、ベタインのラット透過性データからのヒト胎盤透過性予測が可能となり、実際のベタイン透過性との比較により本研究手法の妥当性を最終的に裏付けることができると考えている。

これまでの研究における胎盤トランスポーターの発現情報は定量性に欠け、数多くのトランスポーターが発現することは示されていたものの、そのうちのどのトランスポーターが主要な役割を果たしているのかが不明であった。今回の研究において、LC-MS/MSを用いた胎盤刷子縁膜と側底膜におけるトランスポーターの絶対定量解析を行うことにより、ヒト胎盤における主要なトランスポーターを絞り込めた。ラットでの絶対定量解析には到達しなかったために直接の比較はできないが、絶対定量によって胎盤に高発現していることが示されたトランスポーターの基質についてはラット胎盤透過性が高い。絶対定量解析を行ったトランスポーターの中でも非常に高い発現量が示されたENT1については、基質であるアデノシン、チミジン、ウリジンの胎盤透過性も非常に高い。ENT1よりも発現が低いものの発現が示されたTAUTについても、基質であるタウリンの高い胎盤透過性が示されている（但し、チミジン、ウリジンと比較すると透過性は低い）。これはトランスポーター発現量から胎盤透過性を推定する戦略の妥当性を裏付けるものであり、胎盤関門透過機構におけるトランスポーターの関与について重みづけをする上で非常に重要な情報であるといえる。

今回の研究において、胎盤透過機能解析からはMDR1やBCRPといった排出トランスポーター活性における種差を明らかにし、さらに胎盤組織から刷子縁膜および側底膜を精製する手法を確立して母体側および胎児側細胞膜それぞれにおけるトランスポーター絶対発現量情報を収集することができた。化学物質の胎盤透過機構における種差を決定するメカニズムを完全解明するには至っていないが、その解明に必要な基盤となる評価技術の構築には成功している。本研究戦略の合理性を示すデータは得られており、今後、解析を継続する必要があるものの現時点において研究目標の少なくとも一部は達成できた。

III 本研究を基に発表した論文等

1 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト

- 1) 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, 3356-3363 (2013).

2) .

2 本研究を基にした学会発表の実績

- 1) T. Asada, T. Takanohashi, T. Nishimura, N. Kose, M. Tomi, E. Nakashima: Evaluation of the transplacental transfer from maternal and fetal sides of the placental barrier in vivo, *日本薬物動態学会第26年会* (2011年11月, 広島)
- 2) 登美斉俊、尾崎真由子、宮田優希、西村祥香、樋口慧、西村友宏、中島恵美: 胎盤関門における OAT4 の生理的役割とその発現制御, *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)
- 3) T. Asada, T. Takanohashi, T. Nishimura, M. Tomi, E. Nakashima: In vivo techniques for the evaluation of passages from maternal and fetal sides across the placental barrier, *Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2011* (Dec, 2011, Kuala Lumpur)
- 4) M. Tomi, M. Ozaki, K. Higuchi, T. Nishimura, E. Nakashima: OAT4/SLC22A11-mediated uptake of 16 α -hydroxy dehydroepiandrosterone sulfate at the placental barrier, *Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2011* (Dec, 2011, Kuala Lumpur)
- 5) K. Oda, T. Nishimura, N. Kose, M. Tomi, E. Nakashima: Estrogen receptor α induction by mitoxantrone increases Abcg2 expression in rat placental cells, *Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2011* (Dec, 2011, Kuala Lumpur)
- 6) M. Tomi, M. Ozaki, S. Nishimura, K. Higuchi, T. Nishimura, E. Nakashima: Role of OAT4 for supplying estriol precursor, 16 α -hydroxy dehydroepiandrosterone sulfate, into the human placenta, *International Symposium of Past, Present and Future of Molecular Pharmacokinetics* (Jan, 2012, Tokyo)
- 7) K. Oda, T. Nishimura, M. Tomi, E. Nakashima: Induction of Abcg2 by mitoxantrone through estrogen receptor α in rat placental cells, *International Symposium of Past, Present and Future of Molecular Pharmacokinetics* (Jan, 2012, Tokyo)
- 8) 山崎万郁, 西村友宏, 樋口慧, 登美斉俊, 中島恵美: 胎盤発現トランスポーター Slc10a3 の組織・細胞内局在解析, *日本薬学会第132年会* (2012年3月, 札幌)
- 9) 登美斉俊、浅田崇史、樋口慧、西村友宏、中島恵美: Uptake index 法によるラット胎盤透過性の in vivo 解析, *日本薬剤学会第26年会* (2012年5月, 神戸)
- 10) 登美斉俊、浅田崇史、樋口慧、西村友宏、中島恵美: Uptake index 法を用いた胎盤関門透過性の解析, *第7回トランスポーター研究会* (2012年6月, 京都)
- 11) Tawara T, Nishimura T, Tomi M, Yamazaki M, Matsushita R, Higuchi K, Maruyama T, Nakashima E: Examining the role of SLC10A3 in the placenta, *International Federation of Placenta Associations Meeting 2012* (Sep, 2012, Hiroshima)
- 12) Eguchi H, Tomi M, Nishimura T, Oda K, Yamazaki M, Yagi R, Usuda M, Higuchi K, Maruyama T, Nakashima E: Characterization of sodium dependent betaine uptake in human placental brush-border membranes, *International Federation of Placenta Associations Meeting 2012* (Sep, 2012, Hiroshima)
- 13) Eguchi H, Tomi M, Nishimura T, Usuda M, Oda K, Yamazaki M, Yagi R, Higuchi K, Maruyama T, Nakashima E: Role of SNAT2 on osmosensitive betaine uptake in the

placenta, 日本薬物動態学会第27回年会 (Sep, 2012, Hiroshima)

- 14) 登美斉俊、江口拡美、西村友宏、磨田真理子、小田憲司、山崎万郁、八木里沙、樋口慧、丸山哲夫、中島恵美: 胎盤関門における SNAT2 を介した浸透圧感受性ベタイン輸送, 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)
- 15) 俵智裕、江口拡美、西村友宏、丸山哲夫、登美斉俊、中島恵美: 胎盤関門機能解析系としてのヒト胎盤細胞膜ベシクルの活用, 日本動物実験代替法学会第25回大会 (2012年12月, 東京)

3 特許及び特許出願の数と概要
ありません

4 その他 (各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等)

- 1) International Federation of Placenta Associations Meeting 2012 (第20回日本胎盤学会学術集会併催) 相馬賞: 江口拡美「Characterization of sodium dependent betaine uptake in human placental brush-border membranes」(上記の学会発表#12 に対する受賞)

IV 主任研究者による研究全体の自己評価

項目	評価結果	評価コメント
1 研究の妥当性	4	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基盤技術は構築できた。
2 研究目標の達成度	3	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、透過機構を完全解明して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。
3 研究成果の有用性	4	胎盤透過性評価技術や、母体側および胎児側細胞膜各々における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。
合 計	11	
総合コメント 化学物質の胎盤透過機構における種差を規定する機構を完全には明らかにできていないが、解明の基盤となる評価技術は構築できた。ABC 排出トランスポーター活性における種差など、本研究戦略の合理性を示すデータも得られている。今後、解析を継続する必要があるものの、現時点において研究目標の少なくとも一部は達成できた。		

注) 評価結果欄は、「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で記述する。