

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08595

研究課題名(和文)胎盤における母体環境ストレス緩和初動因子の機能発現制御

研究課題名(英文)Functional expression of sensing factors against maternal osmotic stress in the placenta

研究代表者

西村 友宏(NISHIMURA, Tomohiro)

慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・准教授

研究者番号：40453518

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：胎盤は母体および胎児間の物質輸送を担う臓器であるが、母体における循環血中の成分変動の影響を緩和し、安定的に機能する作用をもつ。胎盤において、胎児が必要とするアミノ酸の一部はシステムAと呼ばれるアミノ酸輸送機構を介して母体から胎児に供給される。本研究では、このアミノ酸輸送システムAの一部の分子は、母体循環血成分の変動に対し速やかに反応し、特に高い浸透圧ストレス負荷時には他の機能分子に先駆けて発現が増加すること、およびその発現変動機構の一部を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Placenta is an interface between mother and fetus and it has a role of nutrients transfer. The placenta has the function mitigating the osmotic stress exposed from maternal blood. Part of amino acid is transferred via amino acid transport system A from mother to fetus in the placenta. In this study, we clarified that expression of the system A molecule can be more quickly increased in response to the osmotic stress than other molecules and we investigated how the system A molecules is induced by hypertonic stress.

研究分野：生物薬剤学

キーワード：胎盤 胎児成長 トランスポーター アミノ酸 発現調節

### 1. 研究開始当初の背景

胎盤における母体から胎児へのアミノ供給機構の一部にアミノ酸輸送システムA(以下、システムA)が関わる。システムAはアミノ酸の中でも特に小型中性アミノ酸の輸送に関わり、Na<sup>+</sup>依存性に細胞外のアミノ酸を細胞内に取り込むタンパク質である。システムAは、SNAT1 (SLC38A1)、SNAT2 (SLC38A1)、SNAT4 (SLC38A4)の3分子から構成され、妊娠後期の胎盤において機能的発現が多いのはSNAT1およびSNAT2である。胎児成長不全の例において、胎盤のシステムAの輸送活性およびSNAT2の発現量が減少することが知られ、SNAT2がどのように発現調節されるかは、胎児成長にも関わる重要な課題である。

### 2. 研究の目的

SNAT2の発現は高浸透圧により上昇することが報告されており、これは細胞外が高浸透圧になると細胞が凝縮し、特に高い浸透圧の場合には細胞死を招くため、浸透圧物質の細胞内濃度を高めることで細胞死を免れる細胞自身の保護機構と考えられる。本研究では、胎盤の細胞においてSNAT2が細胞外環境に应答して発現調節が起こるか、さらにどのような機構で調節されるのかを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

ラット条件的不活化胎盤 syncytiotrophoblast 細胞株 TR-TBT18-1 を用いて、高浸透圧ストレス負荷時のSNAT2発現変動を解析した。また、SNAT2プロモーター領域および3'UTR(Untranslated region)領域をクローニングし、それぞれをルシフェラーゼ発現ベクターに組み込むことで、浸透圧に対する応答反応領域および機構を解析した。

### 4. 研究成果

(1) TR-TBT18d-1細胞において高い浸透圧負荷時にはSNAT2の発現が、浸透圧負荷後2時間以内に上昇開始することがわかった。高浸透圧により発現誘導されることが知られる分子には、タウリントランスポーター(TauT / SLC6A6)やベタイン/GABAトランスポーター(BGT1 / SLC6A12)が知られる。TauTおよびBGT1の発現変動も同時に解析したところ、TauTは高浸透圧負荷後、約8時間で発現上昇し、またBGT1は8時間以降24時間程度まで発現上昇することが観察された。これらにより、SNAT2はTauTやBGT1に先駆けて発現上昇する分子であることが示された。

(2) TauTおよびBGT1の発現誘導機構は転写因子TonEBPを介する。TonEBPはプロモーター領域のTonE(Tonicity sensitive element)に結合するタンパクであるため、SNAT2のプロモーター領域にもTonE配列が存在するかを検討した。しかしながら、SNAT2のプロモ

ーター領域には、現在知られるTonE配列に相当する領域は発見できなかった。これらの結果により、SNAT2はBGT1やTautなどとは異なる浸透圧発現制御を受ける可能性が考えられた。

(3) SNAT2のプロモーター活性が高浸透圧により変化するかを解析するため、ラットSNAT2のゲノムよりSNAT2転写開始領域より上流の約4,000bpをクローニングし、ルシフェラーゼ活性により転写活性を評価した。TR-TBT18d-1において、高いルシフェラーゼ活性を示す領域を見出したことから、SNAT2の発現に関わる領域を同定できた。しかしながら、浸透圧によるルシフェラーゼ活性への影響は観察されなかったことから、SNAT2の転写活性は高浸透圧を受けても活性上昇しないとの結論を得た。

(4) SNAT2のmRNAは高浸透圧負荷時には上昇するが、転写活性は変動しないとの結果を前項までに得たことから、SNAT2 mRNAの安定性の向上が発現上昇に関与する可能性について検証した。TR-TBT18d-1細胞において転写阻害剤の存在下で、高浸透圧を負荷したところ、等張条件に比較して、SNAT2 mRNA分解速度は顕著に抑制された。したがって、高浸透圧負荷時にはSNAT2 mRNAの分解抑制は少なくとも一部、SNAT2 mRNA発現上昇に関与していることが考えられた。

(5) 一般にmRNAの安定性に関係すると考えられる3'UTRが、SNAT2 mRNAの高浸透時の分解抑制に関与するかを検証するため、SNAT2 mRNA 3'UTRである約2.7kbをクローニングした。さらにレポーター遺伝子の下流に導入し、高浸透圧負荷時の発現変動を解析した。SNAT2 3'UTR非導入ベクターに比較して、SNAT2 3'UTR導入ベクターにおいては、高浸透圧時における発現量の等張時に対する比が上昇した。これらによりSNAT2 3'UTRには高浸透圧の刺激を受けた際に、細胞内での安定性向上に関わる作用を示す領域があることが明らかになり、SNAT2の発現上昇機構の一部が示された。

### 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 9 件)

Nishimura T, Higuchi K, Yoshida Y, Sugita-Fujisawa Yuki, Kojima K, Sugimoto M, Santo M, Tomi M, Nakashima E. Hypotaurine is a substrate of GABA transporter family members GAT2/Slc6a13 and TAUT/Slc6a6. Biol Pharm Bull. in press

査読あり

Inagaki M, Nishimura T, Akanuma SI, Nakanishi T, Tachikawa M, Tamai I, Hosoya KI, Nakashima E, Tomi M. Co-localization of microsomal prostaglandin E synthase-1 with cyclooxygenase-1 in layer II of murine placental syncytiotrophoblasts. *Placenta*. 53:76-82. (2017) doi: 10.1016/j.placenta.2017.04.002.6. PMID: 28487024. 査読あり

Noguchi S, Nishimura T, Mukaida S, Benet LZ, Nakashima E, Tomi M. Cellular Uptake of Levocetirizine by Organic Anion Transporter 4. *J Pharm Sci*. 106(9):2895-2898 (2017) doi: 10.1016/j.xphs.2017.03.026. PMID: 28385546. 査読あり

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*. 32(2):151-156 (2017) doi: 10.1016/j.dmpk.2016.12.001. PMID: 28209435. 査読あり

Takahashi Y, Nishimura T, Maruyama T, Tomi M, Nakashima E. Contributions of system A subtypes to -methylaminoisobutyric acid uptake by placental microvillous membranes of human and rat. *Amino Acids*. 49(4): 795-803 (2017) doi:10.1007/s00726-017-2384-7. PubMed PMID: 28161797. 査読あり

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*. 65:375-381 (2016) doi: 10.1016/j.reprotox.2016.09.002. 査読あり

Tomi M, Eguchi H, Ozaki M, Tawara T, Nishimura S, Higuchi K, Maruyama T, Nishimura T, Nakashima E. Role of OAT4 in uptake of estriol precursor 16 $\beta$ -hydroxy dehydroepiandrosterone sulfate into human placental syncytiotrophoblasts from fetus. *Endocrinol*, 156(7):2704-12 (2015) doi: 10.1210/en.2015-1130 査読あり

Noguchi S, Nishimura T, Fujibayashi A, Maruyama T, Tomi M, Nakashima E. OAT4-Mediated Transport of Olmesartan at Basal Plasma Membrane of Human Placental Barrier. *J Pharm Sci*, 104(9): 3128-3135

(2015) doi: 10.1002/jps.24434

Nishimura T, Duereh M, Sugita Y, Yoshida Y, Higuchi K, Tomi M, Nakashima E. Protective effect of hypotaurine against oxidative stress-induced cytotoxicity in rat placental trophoblasts. *Placenta*, 36(6): 693-698 (2015) doi: 10.1016/j.placenta.2015.02.014 査読あり

〔学会発表〕(計 4 件)

Tomohiro Nishimura, Emi Nakashima, Masatoshi Tomi. Induction Mechanism of Sodium-dependent Amino Acid Transporter 2 (SNAT2) in Rat Placental Trophoblasts. The 1st Workshop for Japan-Korea Young Scientists on Pharmaceuticals, Jun 24-25, 2016, Kyoto

Tomohiro Nishimura, Keisuke Yoshida, Yu Takahashi, Masatoshi Tomi, Emi Nakashima. Acute Induction of sodium-dependent neutral amino acid transporter 2 (SNAT2) expression by hyperosmotic condition in placental syncytiotrophoblasts. 11th International ISSX (International Society for the Study of Xenobiotics) meeting, Jun 12-16, 2016, Busan, Republic of Korea

Tomohiro Nishimura, Tomoe Kojima, Yu Takahashi, Masatoshi Tomi, Emi Nakashima. Induction of sodium-dependent neutral amino acid transporter 2 (SNAT2) by hypertonic stress in placental syncytiotrophoblasts. AFPS (Asian Federation for Pharmaceutical Sciences) Conference 2015, Nov 25-27, 2015, Bangkok, Thailand

西村友宏、小澤夏美、高橋優、登美斉俊、中島恵美 胎盤 trophoblast における SNAT2 の高浸透圧刺激による急速発現調節、第 30 回日本薬剤学会年会、2015/5/21(木)-23(土)、長崎

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

西村 友宏 (NISHIMURA, Tomohiro)  
慶應義塾大学・薬学部・准教授  
研究者番号：40453518

##### (2) 研究分担者

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

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )