

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18929

研究課題名(和文)胎盤トランスポータによる抗てんかん薬輸送と胎児リスク低減に向けた多角的アプローチ

研究課題名(英文)Transport mechanism of antiepileptic drugs in the placenta and multidirectional approaches for risk reduction to the fetus

研究代表者

古堅 彩子 (FURUGEN, Ayako)

北海道大学・薬学研究院・助教

研究者番号：90767261

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、胎盤における抗てんかん薬の輸送機構について検討することにより、胎児リスクの低減に繋がる情報を得ることを目的とした。各種新規抗てんかん薬の胎盤細胞における蓄積は、ガバペンチン、ラモトリギン、レベチラセタム、トピラマートの順であった。また、各種薬剤の輸送特性について検討したところ、ガバペンチン、ラモトリギンおよびバルプロ酸の胎盤細胞への取り込みにトランスポータが関与する可能性を示した。さらに、各種トランスポータの阻害剤およびsiRNAを用いた検討により、ガバペンチンの輸送にはL-type amino acid transporter 1 (LAT1) が寄与することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study was to investigate the mechanism of antiepileptic drug transport across the placenta to reduce their risk to the fetus. The accumulated amounts of antiepileptic drugs in the placental cells were in the order, gabapentin > lamotrigine > levetiracetam > topiramate. We concluded that the influx of gabapentin, lamotrigine, and valproate into the placental cells was transporter-mediated. Furthermore, an experiment using transporter inhibitors and siRNAs indicated that L-type amino acid transporter 1 (LAT1) largely contributed to the transport of gabapentin into the placental cells.

研究分野：医療系薬学

キーワード：抗てんかん薬 胎盤 トランスポータ ガバペンチン ラモトリギン バルプロ酸 葉酸

1. 研究開始当初の背景

てんかんは、妊婦の0.3-0.5%が罹患しているともいわれる疾患であり<sup>(1)</sup>、妊娠時においても抗てんかん薬が服用される。妊娠時のてんかん治療では、発作が母児へ及ぼすリスクと、抗てんかん薬による児へのリスクの両方を考慮する必要がある。バルプロ酸等の抗てんかん薬は、妊娠初期の服用による催奇形性や、妊娠期を通して児の認知機能低下に関連する可能性がある等、胎児へのリスクが問題となる<sup>(2)</sup>。このように抗てんかん薬は、妊娠期に渡る安全性について考慮する必要があるため、各妊娠段階における胎盤輸送メカニズムを解明することは重要である。

一方、胎盤トランスポータは、薬物や栄養素の胎盤通過性に関わる重要な因子である。しかしながら、抗てんかん薬の胎盤輸送メカニズムに関する、妊娠期を通じた包括的な情報は不足している。近年、新規の抗てんかん薬が本邦においても相次いで承認されている。新規抗てんかん薬と胎児リスクに関する疫学的研究は積み重ねられつつあるが十分ではなく、その胎盤輸送メカニズムについても十分解明されていない。また、新規抗てんかん薬は、バルプロ酸等の従来の抗てんかん薬と併用されるものの、多剤併用時の輸送量については不明である。

2. 研究の目的

本研究は、抗てんかん薬の胎盤輸送に寄与するトランスポータを明らかにした上で、臨床上考え得る問題点に関しても検討することにより、抗てんかん薬による胎児リスクの低減に繋がる基礎情報を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

胎盤の細胞モデルとして、ヒト絨毛癌由来の BeWo 細胞および JEG-3 細胞を使用した。各抗てんかん薬を基質とした取り込み実験を行い、細胞への輸送量を評価した。抗てんかん薬は、LC/MS/MS により定量を行った<sup>(3)</sup>。また、トランスポータのタンパク質発現量は Western blotting により評価した。また、胎盤細胞の細胞内容積は、<sup>3</sup>H]-H<sub>2</sub>O および <sup>14</sup>C] inulin-carboxyl の分布量を調べることにより見積もった。

4. 研究成果

はじめに、胎盤モデル細胞における新規抗てんかん薬の蓄積量について評価を行った。新規抗てんかん薬のうち、本邦においても広く使用されているガバペンチン (GBP)、ラモトリギン (LTG)、レベチラセタム (LEV)、トピラマート (TPM) の4種類に着目した。BeWo 細胞および JEG-3 細胞における蓄積パターンは類似した傾向を示し、GBP > LTG > LEV ≈ TPM の順で高かった (表1)。最も蓄積量が高かった GBP は、親水性の化合物である。したがって、各薬剤の蓄積量は薬物の化学的

性質から予測される膜透過性とは異なることが示唆された。また、BeWo 細胞および JEG-3 細胞の細胞内容積は、それぞれ 5.12 ± 0.22 μL/mg protein、4.83 ± 0.82 μL/mg protein と算出された。細胞内容積より各薬剤の細胞内濃度を見積もったところ、GBP および LTG の細胞内濃度は細胞外と比較して高い可能性が示された。したがって、GBP および LTG は細胞外から細胞内方向へ輸送されている可能性が考えられた。

表1 新規抗てんかん薬の胎盤細胞における蓄積

	細胞内蓄積量 (pmol/mg protein/30 min)	
	JEG-3	BeWo <sup>[3]</sup>
GBP	9410 ± 1191	14055 ± 2660
LTG	744 ± 81	1272 ± 81
LEV	454 ± 13	315 ± 31
TPM	443 ± 9	195 ± 9

BeWo 細胞および JEG-3 細胞を各薬剤 (50 μM) で処理し、30 分後における細胞内蓄積量を LC/MS/MS で定量した。データは、平均値 ± 標準誤差で示した。

高い蓄積性を示した GBP の輸送特性に関して更なる検討を行った。BeWo 細胞および JEG-3 細胞における GBP 輸送は高濃度において飽和し、Eadie-Hofstee plot は一相性を示した (図1)。したがって、胎盤細胞における GBP 輸送には1種類の輸送担体が関与していると考えられた。また、速度論的パラメータは、表2のように算出された。GBP の血中濃度範囲は 10 - 120 μM であることから<sup>(4)</sup>、当担体は輸送に寄与し得るものと考えられる。

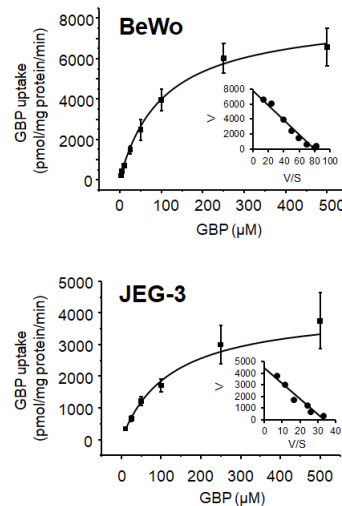


図1 胎盤細胞における GBP 輸送

BeWo 細胞および JEG-3 細胞を種々の濃度の GBP で処理し、5 分後における細胞内 GBP 量を LC/MS/MS で定量した。データは、平均値 ± 標準誤差で示した。

表2 GBP 輸送の速度論的パラメータ

	K <sub>m</sub> (μM)	V <sub>max</sub> (pmol/mg protein/min)
BeWo <sup>[3]</sup>	105.4 ± 6.4	8153 ± 348
JEG-3	123.7 ± 22	4136 ± 522

データは、平均値 ± 標準誤差で示した。

GBP の各種臓器における輸送に関しては、これまでに、脳血管内皮細胞において L-type amino acid transporter 1 (LAT1, *SLC7A5*) が、腎排泄において organic cation/carnitine transporter 1 (OCTN1, *SLC22A4*) が寄与する可能性が示されている<sup>(5,6)</sup>。そこで、これらのトランスポータの関与について評価した。BeWo 細胞における GBP 輸送は、各種 OCTN 阻害剤 (cimetidine, quinidine, L-carnitine, TEA) による影響を受けなかった (図 2)。一方、LAT 阻害剤である BCH は、GBP 輸送を有意に減少させた。

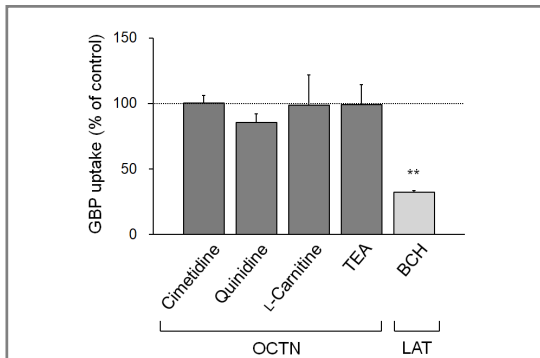


図 2 GBP 輸送に対する OCTN および LAT 阻害剤の影響

BeWo 細胞を GBP (100  $\mu$ M) および各種阻害剤 (1 mM) で処理し、5 分後における細胞内 GBP 量を LC/MS/MS で定量した。データは、平均値  $\pm$  標準誤差で示した (\*\*;  $p < 0.01$ )。

また、siRNA により LAT1 をノックダウンすることにより GBP 輸送は有意に低下することが示された (図 3)。これらの結果から、胎盤細胞における GBP 輸送には LAT1 が主に寄与していることが示唆された。

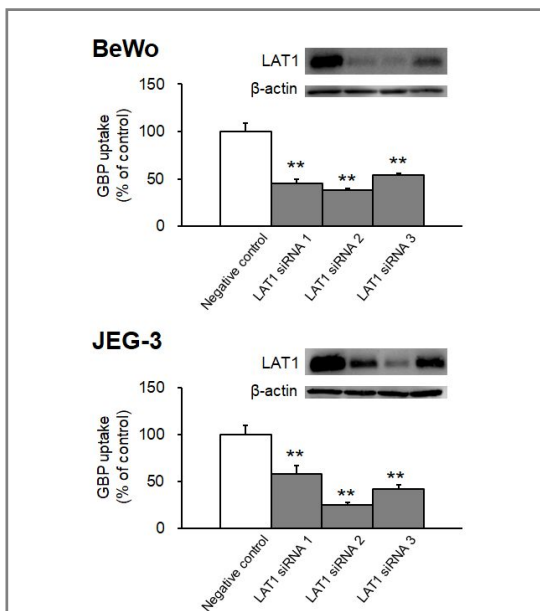


図 3 LAT1 siRNA が GBP 輸送に及ぼす影響

LAT1 をノックダウンした BeWo 細胞および JEG-3 細胞に GBP (100  $\mu$ M) を処理し、5 分後における細胞内蓄積量を LC/MS/MS で定量した。データは、平均値  $\pm$  標準誤差で示した (\*\*;  $p < 0.01$ )。LAT1 タンパク質発現レベルは Western blotting により評価した。

LAT1 は中性アミノ酸や甲状腺ホルモン等の生体物質を輸送するため<sup>(7)</sup>、これらの物質が胎盤細胞における GBP 輸送に及ぼす影響について検討した。芳香族アミノ酸、分岐鎖アミノ酸、含硫アミノ酸の共存は、GBP 輸送を強く阻害した (図 4A)。また、甲状腺ホルモン ( $T_3$ ,  $T_4$ ) の共存下においても阻害が確認された (図 4B)。これらの結果から、胎盤における GBP 輸送は、母体血中のアミノ酸・甲状腺ホルモンによる影響を受ける可能性が推測される。また、これらの生体基質の輸送を GBP が阻害する可能性についても考慮する必要があると考えられた。

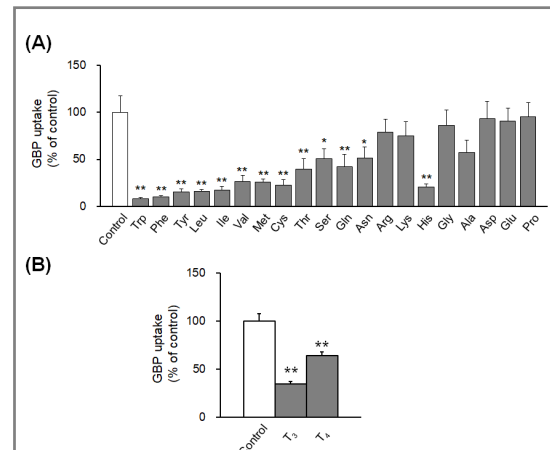


図 4 生体基質が GBP 輸送に及ぼす影響

BeWo 細胞を GBP (100  $\mu$ M) および生体基質 (1 mM アミノ酸もしくは 10  $\mu$ M 甲状腺ホルモン) で処理し、5 分後における細胞内 GBP 量を LC/MS/MS で定量した。データは、平均値  $\pm$  標準誤差で示した (\*\*;  $p < 0.01$ ; \*;  $p < 0.05$ )。

先述のように、抗てんかん薬は多剤を併用して使用される場合がある。そこで、各種抗てんかん薬が GBP 輸送に及ぼす影響について評価した。その結果、今回検討を行った抗てんかん薬は、GBP 輸送に対して直接的な影響を及ぼさないことが示された (表 3)。

表 3 各種抗てんかん薬が GBP 輸送に及ぼす影響

抗てんかん薬	Uptake (% of control)
レベチラセタム	99 $\pm$ 4
トピラマート	92 $\pm$ 2
ラモトリギン	92 $\pm$ 9
カルバマゼピン	88 $\pm$ 6
フェニトイン	93 $\pm$ 6
フェノバルビタール	89 $\pm$ 7
バルプロ酸	83 $\pm$ 7
ゾニサミド	93 $\pm$ 12
ニトラゼパム	100 $\pm$ 9
クロバザム	84 $\pm$ 8
クロナゼパム	91 $\pm$ 5

BeWo 細胞を GBP (100  $\mu$ M) および各種抗てんかん薬 (500  $\mu$ M) で処理し、5 分後における細胞内 GBP 量を LC/MS/MS で定量した。データは、平均値  $\pm$  標準誤差で示した。

また、従来から使用されている抗てんかん薬であり、胎児リスクが明らかであるバルプロ酸の輸送についても検討を行った。胎盤細胞におけるバルプロ酸の輸送はプロトン依存性を示すものの、当初予測していた monocarboxylate transporter (MCT) 1 および 4 の関与は低いことが示された。寄与する因子の同定には至らなかったため、更なる検討を行う必要がある。

さらに、妊娠時に重要な栄養素である葉酸に着目し、抗てんかん薬が葉酸輸送に及ぼす影響について評価した。種々の抗てんかん薬は、胎盤細胞における葉酸輸送活性に対して直接的な影響を及ぼさないことが明らかとなった。一方、一部の抗てんかん薬の長期的曝露は葉酸輸送量を変動させることが示唆された。さらに、長期的曝露による葉酸輸送能の変化には、proton-coupled folate transporter (PCFT) や folate receptor  $\alpha$  (FR $\alpha$ ) 等の遺伝子発現変動が関与する可能性を示した。

以上、本研究において、新規抗てんかん薬の胎盤細胞における蓄積性の違いを明らかにした。また、一部の抗てんかん薬の輸送には、トランスポータが寄与していることが示された。さらに、長期的な抗てんかん薬の曝露は、葉酸の細胞内動態を変化させる可能性を見出した。今後も更なる研究を進めるとともに、*in vivo* における検討やトランスポータ活性変動因子に関する検討を行うことで、抗てんかん薬のリスクの低減に向けた方策の構築に繋げたい。

#### <引用文献>

- 1) Viinikainen et al., *Epilepsia* 47:186–192 (2006).
- 2) Tomson et al., *Lancet Neurol.* 10:609–617 (2011).
- 3) Furugen et al., *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 1002:228–233 (2015)
- 4) Patsalos et al., *Epilepsia* 49:1239–1276 (2008).
- 5) Dickens et al., *Biochem. Pharmacol.* 85:1672–1683 (2013).
- 6) Urban et al., *Clin. Pharmacol. Ther.* 83:416–421 (2008).
- 7) Fotiadis et al., *Mol. Aspects Med.* 34:139–158 (2013).

#### 5. 主な発表論文等

##### 〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Yuri Ishiguro, Ayako Furugen, Katsuya Narumi, Ayako Nishimura, Takeshi Hirano, Masaki Kobayashi, Ken Iseki. Valproic acid transport in the choriocarcinoma placenta cell line JEG-3 proceeds independently of the proton-dependent transporters MCT1 and MCT4. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics.* In

*press* (2018). (査読有)

DOI: 10.1016/j.dmpk.2018.03.004.

2. Ayako Furugen, Yuri Ishiguro, Masaki Kobayashi, Katsuya Narumi, Ayako Nishimura, Takeshi Hirano, Ken Iseki. Involvement of L-type amino acid transporter 1 in the transport of gabapentin into human placental choriocarcinoma cells. *Reproductive Toxicology.* 67:48-55 (2017). (査読有)

DOI: 10.1016/j.reprotox.2016.11.002.

##### 〔学会発表〕(計 5 件)

1. 黒澤 優子, 古堅 彩子, 西村 あや子, 鳴海 克哉, 小林 正紀, 井関 健. 胎盤細胞への葉酸輸送に及ぼす抗てんかん薬の影響の評価. 日本薬学会 第 138 年会 (2018).

2. 古堅 彩子. 母体—胎児間および母体—乳児間の物質輸送に着目した、中枢神経系用薬の適正使用に向けた研究. 第 1 回 薬学会北海道支部主催 若手シンポジウム (2017).

3. Ayako Furugen, Yuri Ishiguro, Masaki Kobayashi, Katsuya Narumi, Ayako Nishimura, Ken Iseki. Involvement of L-type amino acid transporter 1 in the transport of gabapentin into human placental choriocarcinoma cells. 紫禁城国際薬剤師フォーラム (2017).

4. 石黒 由梨, 古堅 彩子, 西村 あや子, 小林 正紀, 鳴海 克哉, 井関 健. ヒト胎盤絨毛癌由来 JEG-3 細胞におけるバルプロ酸の輸送機構. 日本薬学会 第 137 年会 (2017).

5. Ayako Furugen, Yuri Ishiguro, Masaki Kobayashi, Katsuya Narumi, Ayako Nishimura, Ken Iseki. THE TRANSPORT MECHANISM OF NEWER ANTIEPILEPTIC DRUGS IN PLACENTAL CELLS : INVOLVEMENT OF L-TYPE AMINO ACID TRANSPORTER 1 IN THE TRANSFER OF GABAPENTIN IN PLACENTAL CELLS. 日本薬物動態学会 第 31 回年会 (2016).

##### 〔図書〕(計 0 件)

##### 〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

##### 〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

古堅 彩子 (FURUGEN, Ayako)

北海道大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号 : 90767261