様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成２３年5月２６日現在

機関番号：１４５０１
研究種目：基盤研究（C）
研究期間：２００８～２０１０
課題番号：２０５９０１３６
研究課題名（和文）妊娠の進行に伴う胎盤の組織変化と生体必須物質透過性との関連

研究課題名（英文）The mechanisms and regulation of placental nutrient transport.

研究代表者
平野　剛（HIRANO TAKESHI）
神戸大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：００３２２８２６

研究成果の概要（和文）：
妊娠初期の胎盤における SNAT3 の発現を初めて明らかにするとともに、かつ妊娠の進行に伴って減少していることを見出した。ヒトサイトトロホブラスト細胞から単離培養した SNAT3 の発現は、シンシチオトロホブラスト細胞へと分化することによって大きく減少した。
これらの調節機構はグルタミン合成酵素の発現とも深く関連しており、SNAT3 は妊娠初期のグルタミン合成に関与し、その供給に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：
Supply of nutrients to the fetus is one of main functions of the placenta. Fetal development is dependent on placental nutrient supply, and insufficient nutrient supply increases the risk of fetal and perinatal diseases. We previously showed that the expression levels of transporters that provide folate to the fetus change with progress of gestation. The expression of SNAT3, the system N transporter, was detected in the early period of pregnancy and its expression level decreased as gestation progressed. SNAT3 was also found to be expressed in isolated human primary cytotrophoblast cells and its expression level was decreased by their differentiation into syncytiotrophoblast cells.
Since this regulation is closely related to glutamine synthetase expression, SNAT3 may play a key role in providing glutamine corresponding to glutamine synthetase function in the early period of gestation. This is the first report on the expression of SNAT3 in the placenta in the early stage of pregnancy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
２００８年度	1,800,000	540,000	2,340,000
２００９年度	1,000,000	300,000	1,300,000
２０１０年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総　計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医療系薬学
科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学
キーワード：妊娠、胎盤、胎児移行性、栄養素、トランスポータ、グルタミン、SNAT3、

１．研究開始当初の背景

血液胎盤関門における物質の透過は、サイトトロホブラスト細胞とシンシチオトロホブラスト細胞という２種の異なる細胞にてそれぞれ様々なトランスポータが機能することによって制御されている。妊娠の進行に伴い胎盤組織は大きく変化し胎盤を形成する細胞が分化・多核化しているにも関わらず、

妊娠期全般を通した比較、あるいは評価した例は極めて少ないのが現状である。

胎児移行性の評価は倫理的な問題もあり系統的な研究が十分ではないため、医薬品開発および医療現場においても大きな課題となっている。本研究の特色は、妊娠期の時間的変化に着目したラットでの結果とヒト満期胎盤での透過性の結果を融合させることにある。これまでの株化細胞、あるいは強制発現細胞を用いたトランスポータとの親和性の解析結果のみでは、最も重要なヒトにおける寄与率に関する考察を困難にしている。また、胎盤における物質透過機構の解明は刷子縁膜での検討が主流であり側底膜側と併せた評価は極めて少なく、ヒト胎盤環流系は胎児移行性を簡便にスクリーニングできる可能性を秘めている。さらに、ヒト胎盤組織を使用している研究室は世界でも少なく、独創的な研究といえる。また、研究代表者は現在も北海道大学病院薬剤部にて薬学専門性を活かした薬剤管理指導業務の活動を行っており、これらの知見を現場へフィードバックできる。

胎盤は物質の透過を規制し特異的な輸送形式を持つことから血液胎盤関門とも呼ばれ、栄養素や薬物等の透過・排出に大きく寄与している。胎盤における栄養素の輸送機構が正常に機能しない場合、胎児への栄養供給が不足するため子宮内胎児発育不全や神経管閉鎖障害の発症リスクが増大する。また、胎児期の慢性的な低栄養状態は青年期以後の生活習慣病の発症に関与し、特に葉酸摂取不足は二分脊椎や無脳症等の先天性脊椎癒合不全を惹起することも示唆されている（Jones HN et al., Placenta,28(8-9), 763-774, 2007）。以上のように、母体から胎児への各種栄養素の輸送能の低下は、胎児の発育に多大な影響を及ぼすことが明らかである。

研究代表者らは、これまでに葉酸の輸送に関与する輸送担体（FRα、RFC、BCRP）の妊娠期を通した発現変動を明らかにした。さらに胎盤機能の特徴である性ホルモンの分泌に着目し、それらが葉酸輸送担体に及ぼす影響を解明した（Yasuda S et al., J. Pharm. Pharmaceut. Sci., 9(1), 133-139, 2006）。一方、胎盤におけるアミノ酸輸送担体の発現様式およびその調節機構に関しては多くの報告がある。しかしながら、妊娠期の進行、すなわち時間依存的な変化に着目してそれらの機構を解析した例はほとんどない。そこで妊娠期を通した胎盤における種々の栄養素トランスポータの発現変動を網羅的に解析・評価することとした。さらには、性ホルモン分泌による発現調節メカニズムと胎盤の生理機能についても考察し、それら発現調節機構の生理的な意義・メカニズムの解明を目的し検討することとした。

２．研究の目的

妊娠の進行に伴い胎盤組織は大きく変化し、かつ胎盤を形成する細胞が分化・多核化しているにも関わらず、妊娠期全般を通して物質透過性を評価した例は極めて少ない。そこで本研究では、胎盤トロホブラスト細胞膜に存在する様々な生体必須物質を輸送するトランスポータの発現変動と生理的な要因との関係を解明することを目的とする。胎児の発育に大きな影響を及ぼす栄養物質などの透過性を評価することにより、新しい生命の健やかな誕生に多大な貢献をもたらす。

（１）妊娠期の時間的変化に着目した各種栄養素トランスポータの発現変動と局在確認
（２）妊娠期を通した胎盤組織の変化と胎盤物質透過性との関連
（３）各種栄養素トランスポータの mRNA 変動機構の解明
（４）性ホルモンによるプロモータ活性の調節機構解析および翻訳制御機構解明
（５）ヒト胎盤モデルを活用した薬剤感受性試験

以上、胎児の発達・発育に深く関与していると考えられる栄養素の供給機構についての知見を得ることができる。まず、ヒト満期胎盤よりサイトトロホブラスト細胞の単離・培養を試みることとし、確立した in vitro モデルを用いて SNAT3 の薬剤感受性評価を行うこととした。また、妊娠初期の栄養素供給および胎盤形成のメカニズムを明らかにすることによって、胎児発育不全の原因解明の一助となる。本研究の目的は SNAT3 の発現、機能ならびに生理的意義を詳細に解析することである。

３．研究の方法

（１）妊娠期の時間的変化に着目した各種栄養素トランスポータの発現変動と局在確認

胎児の発育に必須であるグルコースなどの栄養物質についてもスクリーニング解析を行う。特に、妊娠時期において大きく変動したものを最優先しウエスタンブロット法によってタンパク質発現を確認する。その際にヒト胎盤刷子縁膜および基底膜を分離調製して、各膜画分における量的変化についても検討する。ラットおよびヒト胎盤パラフィン包埋切片、あるいはヒト胎盤絨毛癌由来 BeWo 細胞を用いて、免疫組織化学染色法にて膜への局在を同定する。

（２）妊娠期を通した胎盤組織の変化と胎盤

物質透過性との関連
非代謝性のアミノ酸トランスポータの基質（RI）などを用いて、各妊娠期ラットにおける胎児移行量の評価を行う。さらに、妊娠ラット臍帯を環流することによって、胎盤を介した経時的な移行量についても明らかにできる。また、ラット腎皮質スライス法に準拠して、ラット胎盤についてもミクロトームにて切片処理し、スライス/メディウム比を算出することにより能動的な輸送に関する評価を行う。ヒト満期胎盤を用いた検討は、小腸および腎における膜小胞の調製法を改変し刷子縁膜および側底膜を分離調製する。その標品を用いて迅速ろ過法による取り込み実験を行いイオン勾配などの駆動力の影響およびトランスポータへの親和性を評価する。さらにヒト満期胎盤の一部を拡散チャンバーに装着した環流装置によるヒト胎盤物質透過評価系を新たに構築し、刷子縁膜および側底膜における動態を総合的に精査する。妊娠期における胎盤組織細胞の分化に着目して、ラットおよびヒト満期胎盤から初代培養系を確立し、PKC などの細胞分化誘導剤による影響を物質透過性の観点から評価する。
以上の計画を遂行することにより、妊娠ラット動態、組織スライス法、ヒト満期胎盤膜小胞系、ヒト胎盤環流法、初代培養系などの様々な実験系による評価を行うことが可能となり、多方面からより詳細に検討できる。

（３）各種栄養素トランスポータの mRNA 変動機構の解明
mRNA の変動とタンパクレベルの相関がなければ、トランスポータ強制発現系を用いて、妊娠期に変化しているホルモンを中心にアミノ酸、糖類などを添加することにより mRNA の変動を評価する。さらに、RNA 干渉によるノックダウンによる影響を体内動態、移行性などの観点から検討する。

（４）性ホルモンによるプロモータ活性の調節機構解析および翻訳制御機構解明
BeWo 細胞および妊娠ラット、あるいは強制発現系を用いて性ホルモン添加の影響を検討し、mRNA 変動機構および翻訳制御機構を解明する。宿主細胞にプロモータールシフェラーゼ遺伝子のコンストラクトをトランスフェクトし、ルシフェラーゼアッセイによりその活性を評価する。

（５）ヒト胎盤モデルを活用した薬剤感受性試験
ヒト満期胎盤よりサイトトロホブラスト細胞の単離・培養を確立した in vitro モデル、あるいは BeWo 細胞を用いて薬剤感受性試験を行う。評価する薬物として、嗜好品の影響を評価することを目的としてエタノール、重篤なアシドーシス状態を考慮して緩衝液の液性を pH 6.5、高アンモニア血症を推定して塩化アンモニウム、さらには副作用として高アンモニア血症を引き起こすこともあり、かつ催奇形性が報告されているバルプロ酸ナトリウムとした。各薬物の曝露濃度については最高血中濃度などを考慮して決定し、一定期間の曝露後における SNAT3 mRNA 発現量および細胞生存率について検討する。最も大きな変化を引き起こす条件下では、グルタミン合成酵素、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、その他の臨床検査値などに関しても詳細に検討する。

４．研究成果

（１）妊娠期の時間的変化に着目した各種栄養素トランスポータの発現変動と局在確認

①各種栄養素トランスポータの発現変動と局在確認
胎盤におけるアミノ酸トランスポータの発現変動を明らかにするため、妊娠日齢の異なるラット胎盤を用いて評価した。その結果、System A(SNAT1,2,4) および system y+L(y+LAT1, 4F2hc)は、妊娠の進行に伴い顕著に増加していることが明らかとなった。また、ASCT2(ATB0)は妊娠期全般を通して発現しており、他のトランスポータに比べ比較的緩やかに増加していた。system N(SNAT3, 5, 6)は胎盤における発現が不明とされてきた。今回、ラット胎盤においてそれらの発現を明らかにした。特に、SNAT3 においては mRNA レベル、蛋白質レベルともに妊娠初期から中期の胎盤に多く発現が認められた。さらに、その局在について検討を行った結果、細胞膜画分に発現していることを明らかにした。

②グルタミン合成酵素の発現変動
ラット胎盤におけるグルタミン合成酵素(GS) の mRNA は、妊娠 11 日目に最大であった。また、GS 活性についても妊娠初期から中期胎盤に高かった。さらに、GS 活性と GSmRNA との変動は良く一致していることが示された。妊娠初期胎盤において GS が産生するグルタミンは、SNAT3 を介し胎児へ供給されていると推察される。これまで胎児へのグルタミン供給ルートとして示唆されている Glu-Gln cycle に関与するトランスポータは不明であった。しかしながら、今回得られた結果から、妊娠初期の胎盤では SNAT3 がその役割を担っており、協調的に機能していることが示唆された。

（２）性ホルモンによるプロモータ活性の調節機構解析および翻訳制御機構解明

胎盤における BCRP のプロモータ活性は、エストロゲンレセプタαからエストロゲンレセプタ応答エレメントを介して増強されることが示唆された。しかしながら、プロゲステロンによる BCRP 発現抑制機構は、プロモータとの直接的な作用ではなく間接的に抑制していることを明らかにした。

（３）ヒト胎盤モデルを活用した薬剤感受性試験

①ヒト胎盤からのサイトトロホブラスト細胞(CT cell)の単離

ヒト満期胎盤から primary cell を単離し、CT cell 単離・培養を試みた。その結果、胎盤に多く存在する trophoblast cell の特異的マーカーである cytokeratin 7 に陽性であり、かつ培養した細胞からは分化の指標であるヒト絨毛性ゴナドトロピン（hCG）の分泌が認められた。このことから、単離・培養した CT cell は妊娠の進行を反映した in vitro モデルとして利用できることが示され、SNAT3 の発現などを詳細に検討する目的で有効に活用した。

②CT cell における SNAT3、グルタミン合成酵素(GS)の発現

単離した CT cell を用い SNAT3 と GS の mRNA 発現変動を検討した結果、SNAT3 と GS の mRNA 発現は CT cell からシンシチオトロホブラスト細胞への分化に伴い顕著に減少することを明らかにした。そのことから、CT cell 内で GS が産生するグルタミンは SNAT3 を介し胎児へ供給されていることが推察され、ヒト胎盤において SNAT3 と GS は協調的に機能していることが示唆された。

③グルタミン輸送担体（SNAT3）およびグルタミン合成酵素（GS）に及ぼす薬剤感受性の評価

バルプロ酸の妊婦への投与は原則禁忌とされているが、治療上の有益性が危険性を上回ると判断された場合、妊婦にも投与されることがある。妊娠中のバルプロ酸服用の副作用として、胎児の発育不全や精神発達遅延が報告されているが、その詳細な機序は不明である。そこで、単離したヒト胎盤 cytotrophoblast cell をバルプロ酸含有メディウムにて播種・培養した。バルプロ酸曝露群では、播種 1 日後における hCG の分泌量は同程度であったにも関わらず、SNAT3 と GS の発現は減少することが示された。SNAT3 と GS が担う Glu-Gln サイクルの総合的な機能抑制は、胎児へのグルタミン供給の阻害のみならず、アンモニアやグルタミン酸を胎児血中に蓄積させる一因になり得ると考えられる。一方、播種 3 日後の hCG 分泌量は著しく減少し、妊娠初期のバルプロ酸服用は胎盤形成に障害を与えることが示唆された。これらの結果より、バルプロ酸による胎児発育不全・精神発達遅延には、GS と SNAT3 抑制によるアンモニア蓄積と胎盤形成の遅延が関与していることが示唆された。

④ヒト胎盤細胞におけるグルタミン輸送担体 SNAT3 に及ぼすエタノールおよびアセトアルデヒドの影響

妊娠初期モデルとして BeWo 細胞を用い、エタノールおよびアセトアルデヒドを一定時間曝露した。その結果、SNAT3 はエタノール濃度に依存して増加し、胎児側に存在する y+LAT1 と ASCT2 は減少することを明らかにした。さらに、エタノール曝露群においては、ナトリウム依存的な能動輸送部分の取り込み増加が認められた。以上の結果から、グルタミンが細胞内に滞留することが推察され、妊娠初期の飲酒は胎児へのグルタミン供給不足や胎盤の障害を招くことが示唆された。

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７件）

１． Sato Y, Itagaki S, Kurokawa T, Ogura J, Kobayashi M, <u>Hirano T</u>, Sugawara M, Iseki K., In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid.
International Journal of Pharmaceutics, 403(1-2), 136-138 (2010).査読有

２．Yoshioka C., Yasuda S., Kimura F., Kobayashi M., Itagaki S., <u>Hirano T.</u>, Iseki K., Expression and role of SNAT3 in the placenta.
Placenta, 30(12), 1071-1077(2009).査読有

３．Yasuda S., Kobayashi M., Itagaki S., <u>Hirano T.</u>, Iseki K., Response of the ABCG2 promoter in T47D cells and BeWo cells to sex hormone treatment.
Molecular biology reports, 36(7) 1889-1896, (2009).査読有

４．林えり子、小林正紀、高橋夏子、<u>平野剛</u>、板垣史郎、山田武宏、井関健, In vitro実験系によるFOLFIRI療法およびmFOLFOX6 療法レジメンの有効性およびEGFR発現変動の評価.
医療薬学, 36(12), 855-862 (2010). 査読有

５．板垣史郎、中田千絵、<u>平野剛</u>、鷹野瑠美、笠師久美子、菅原満、高橋夏子、小林正紀、

井関健，放射線治療に伴う口腔粘膜障害の予防・軽減効果が期待される物質の探索
医療薬学，36(9)，696-702 (2010). 査読有

６．斎藤由起子、平野剛、沖洋充、笠師久美子、菅原満、小林正紀、高橋夏子、板垣史郎、井関健，In vitro実験系による肺がん化学療法レジメンの抗腫瘍効果の評価.
医療薬学，36(4)，220-226 (2010). 査読有

７．植田貴史、山森元博、小野由加里、田中健太、松本久美子、大松秀明、角本幹夫、槇本博雄、平野剛、平井みどり，ACMIA法で異常高値を示す症例の判別法の検討.
TDM研究，27(4)，168-172 (2010). 査読有

〔学会発表〕(計２件)
１．上野祐太朗、山本和宏、大松秀明、平野剛、平井みどり、胎盤栄養素トランスポータに及ぼすエタノールの影響
日本薬学会第131年会（静岡）
平成23年3月29日、ツインメッセ静岡

２．吉岡千尋、安田哲、小林正紀、板垣史郎、平野剛、井関健、妊娠進行に伴うアミノ酸トランスポータの発現変動評価
第２３回日本薬物動態学会（熊本）
平成20年10月30日、熊本センターホテル

６．研究組織
(1)研究代表者
平野　剛（HIRANO TAKESHI）
神戸大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：00322826
（２００８年度）
北海道大学・大学院薬学研究院・講師