

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590158

研究課題名（和文） 胎盤関門のダイナミクスを制御するトランスポーター-エズリン複合体

研究課題名（英文） Regulatory role of ezrin on transportsome at the blood placenta barrier

研究代表者

崔 吉道 (SAI YOSHIMICHI)

金沢大学・附属病院・准教授

研究者番号：40262589

研究成果の概要（和文）：胎盤関門の物質輸送を担うトランスポータータンパク質複合体の制御因子としてエズリンの役割を解明することを目的とした。胎盤関門細胞株 TR-TBTs や妊娠ラット、エズリン遺伝子欠損マウスを用いて研究を行ったところ、エズリンは合胞体性栄養膜細胞の母体血側細胞膜の裏打ちタンパク質として妊娠経過に伴う胎盤の成熟と共に時期特異的に発現し、ヒポタウリン輸送系（Slc6a13）やその他の輸送系を細胞膜へ局在化させる機能を担うとともに機能調節因子として働くことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：This study was aimed to clarify the regulatory role of ezrin on transporter complex (transportsome) at the placenta barrier. Our study using syncytiotrophoblast cell line TR-TBTs, pregnant rats as well as knockout mice lacking ezrin, scaffold protein that links membrane proteins to the cortical actin, have suggested that ezrin is located at the apical membrane of syncytiotrophoblasts during the course of pregnancy and works as a functional regulator in the transportsome containing a hypotaurin transporter Slc6a13.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：薬物動態学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：トランスポーター、生体膜輸送、胎盤関門、妊娠時薬物療法

1. 研究開始当初の背景

胎盤は、胎児の成長とともに成熟し、妊娠経過が進むにつれてその構造と機能が顕著に変化するダイナミックな臓器である。従来、主にヒト満期胎盤を用いた灌流実験などの

研究結果から、胎盤は脆弱な関門であり薬物透過性が高いことが通説とされてきた。また薬物の胎盤透過メカニズムは脂溶性に依存した受動拡散が主であると考えられてきた。しかし、分娩により剥離した胎盤は構造的に変化しており、妊娠中の胎盤透過性の指標と

はならない。

胎盤関門の機能的実体は、母体血と胎児血とを隔てる絨毛上皮を構成するシンシチオトロホプラストである。シンシチオトロホプラスト細胞膜上に発現するトランスポーターは、胎児への栄養供給とともに薬物の透過バリアーとして働くと考えられることから、胎児毒性や薬物間相互作用など、妊婦の薬物療法を最適化する上で重要な研究課題と位置づけられる。

妊娠中の薬物療法は極力避けられる傾向にあるが、子宮収縮薬や抗けいれん薬、AIDS治療薬、その他の慢性疾患治療薬など必要な薬物も多く存在する。胎児毒性は、薬物に対する胎児の感受性と胎児への移行性の両方の影響を受ける。生理活性物質の胎盤関門輸送は、正常な胎児発育に必須である。薬物がこのシステムを利用して胎盤を透過ために起こる胎児毒性や、薬物と生理活性物質輸送との相互作用については良く分かっていない。妊娠時薬物療法の最適化にはこれらの機序を解明することが重要である。

胎盤はその構造に大きな種差があることが知られている (Enders and Blankenship, *Adv Drug Deliv Rev* 1999)。ヒトとげっ歯類の胎盤は同じ血絨毛胎盤に分類され比較的類似した構造を持つが、ヒトのシンシチオトロホプラストが1層の上皮細胞であるのに対して、げっ歯類は母体血側および胎児血側にそれぞれ面した2層の細胞層がギャップジャンクションで結合した構造をもつ。ヒトでは1種類の細胞が関門機能の全てを担うが、げっ歯類では2種類の細胞が担うので、両細胞の機能を比較することにより関門機能の分子機構を解析出来るメリットがある。

研究代表者が本研究を開始した当初所属していた慶應義塾大学薬学部中島研究室では、温度感受性 SV40 T-抗原遺伝子導入ラットから2層の各シンシチオトロホプラストの性質を有する新たな胎盤培養細胞株 (TR-TBT 18d-1 および TR-TBT 18d-2) が樹立されていた (Kitano et al. *J Cell Physiol* 2002)。これらの細胞株に既存の細胞株で欠損する多くのトランスポーターが発現し、薬物や生理物質の輸送系が機能することを明らかにされていた。

近年、トランスポーターの apical 膜への局在化機構に PDZ タンパク質等の scaffold タンパク質が関与することが示されている。エズリンは NHERF-1 等の PDZ タンパク質と相互作用することが明らかとなっており、また、NHE3、P-糖タンパク質、CFTR および GLUT1 などと相互作用し、機能に影響を与えている可能性が示唆されている (Luciani et al. *Blood* 2002, Reed et al. *Mol Biol Cell* 2005, Sun et al. *J Biol Chem* 2000, Huang et al. *J Cell Sci* 2003)。

両細胞株を用いて DNA マイクロアレイにより特異的な遺伝子を網羅的に解析したところ、ERM ファミリーのエズリンが1層目に高発現することの予備的結果が得られたことから、この分子が apical 膜に発現するトランスポーターの細胞内局在性制御に関わるのではないかと考えた。さらに予備的な検討を行ったところ、胎盤における発現の時間推移は妊娠 12 日から 14 日目に向かって発現が急上昇し、胎盤の構造と機能が成熟する準備期間と非常に良く一致した。エズリン遺伝子をホモで欠損したマウス (Ez^{-/-}マウス) は、生後、体重が増加せず生後約 1.5 週目までに死亡する。主な原因として消化管上皮細胞の微絨毛の形成不全による吸収の低下が考えられている (Tamura et al. *J Cell Biol* 2004)。また、ヘテロマウスを交配した結果がメンデル則に従わず、一部が胎生致死となっているものと考えられたことから、更に予備的な検討を進めたところ、Ez^{-/-}マウスは、胎児の段階で既に生育が抑制されている可能性が示唆された。このことはエズリンの欠損が胎盤関門機能を阻害し胎児への栄養供給に影響を与えたのではないかと考えた。

2. 研究の目的

これらの背景から、研究代表者らはエズリンは胎盤の上皮細胞の微絨毛の構成要素として、微絨毛の形成に必須であると考え、時期特異的に働く胎盤関門機能 (物質輸送インターフェイス) の制御メカニズムとして、エズリンがトランスポーター複合体の制御因子として極めて重要な役割を担うとの仮説を着想するに至り、以下の点を中心に検討を行った。

(1) 胎盤関門の物質分子基盤となるトランスポーターによる生理物質と薬物の認識および詳細な輸送機構の解明

(2) トランスポーター複合体としてのエズリンの役割の遺伝子欠損マウス等を用いた解明

3. 研究の方法

(1) 胎盤培養細胞株 (TR-TBTs) を用いた *in vitro* 実験

マルチウェルプレートに培養した TR-TBTs 細胞を放射性標識したヌクレオシド等生理物質および薬物と一定時間 37°C でインキュベート後、細胞を緩衝液で洗浄し、細胞内に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターで定量した。一部の化合物については非標識体を API-3200 LC-MS/MS システムを用いて定量を行った。

(2) ラットおよびエズリン遺伝子欠損マウスを用いた実験

①エズリンのヘテロ欠損マウス (Ez+/-) を交配した。同腹仔として Ez-/-、Ez+/-、Ez+/+ の胎児と起源を同じくする胎盤を得た。対応する胎児の一部をジェノタイピングに用いた。同腹仔の一部は胎生致死となり、出生に至ったマウスも野生型やヘテロの同腹仔と比べて体重が増加せず、生後約 1.5 週目までに死亡する (Tamura et al J Cell Biol 2004)。

②ヒトの妊娠 5 週から 11 週は器官形成期とされ、薬物療法のターゲットはそれ以降となる。げっ歯類では、16 日 (マウス)あるいは 18 日 (ラット)以降がそれに相当するため、対応する時期の妊娠動物を用いて in vivo 実験を行った。

③胎盤より Alonso 等の方法 (Biochem J 1991) を一部改良して刷子縁膜小胞を調製し、迅速濾過法を用いて取り込み実験を行った。

④臍帯動静脈に 24G カテーテルでカニューレーションを施し、胎盤灌流により薬物の胎盤関門透過性を in situ で評価した (Sai et al Drug Metab Dispos 2010)。

(3) 免疫化学的手法を用いた検討

妊娠マウスおよびラットをパラホルムアルデヒドで全身灌流により固定後、摘出した胎盤から凍結切片を作成した。用いた主な抗体を以下に記した。

Anti-ezrin antibody (H-276, SantaCruz Biotechnology), Anti-P-glycoprotein monoclonal antibody (C219, Signet Pathology Systems) Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen)

プレパラートは DAPI (核染色試薬) を含有する Vectashield Hard set (Vector Laboratories)を用いて封入した。

免疫沈降およびウエスタンブロットは定法に従って行った。

(4) CE-TOF-MS を用いたメタボロミクス解析：慶應義塾大学先端生命科学研究所の曾我朋義教授の協力を得て、胎盤組織および胎児血の分析を行った。

4. 研究成果

(1) 胎盤関門細胞株 TR-TBTs を用いた in vitro 薬物輸送活性の解析の結果、TR-TBT 細胞を用いて胎児および胎盤の成熟に必要なウリジンおよびアデニンを基質として取り込み実験を行い、胎盤関門の詳細なスクレオシド取り込み機構の解析を行った。更に、フルオロウラシル、シタラビン、ビダラビン、ジドブジン、ガンシクロビル、フルシトシン、ミゾリビン、カフェイン、テオフィリン、アロプリノール、ブクラデシン、プロピルチオウラシル、アミトリプチリン等、臨床で用

いられる薬物について取り込みに対する阻害実験を行い、IC₅₀ 値を算出した。いずれも臨床血中濃度よりも高く、これらの薬物が胎盤関門における生理的なスクレオシド輸送を阻害する可能性は低いことが示唆された。

(2) スクレオシド薬物であるジダノシンとジドブジンの胎盤関門への取り込み機構を明らかにした。特にジドブジンについては、ステロイドホルモンであるデヒドロエピアンドロステロン硫酸により、その取り込みが特異的に促進されることを見出した。速度論的な解析を行ったところ、DHEAS がジドブジン取り込みの Km 値を低下させ、トランスポーターに対する基質の親和性を上昇させることで、ジドブジン取り込みクリアランスが上昇することが明らかとなった。

(3) エズリンのヘテロ欠損マウスを交配し Ez-/-、Ez+/-、Ez+/+ の同腹仔を得て、母体血濃度同一条件下で胎盤および胎児血について、エズリン欠損により減少あるいは増加する低分子有機化合物を CE-TOF-MS を用いたメタボロミクス解析により、網羅的に探索した結果、エズリンを欠損するマウスの胎児血および胎盤内において、タウリン生合成の中間物質で律速段階にあるヒポタウリン濃度が顕著に減少することが明らかとなった。このことから、胎盤関門にヒポタウリン輸送系が存在すること、この輸送系の機能がエズリンにより制御されていることが示唆された。

Fetus/Mother Plasma Conc. Ratio

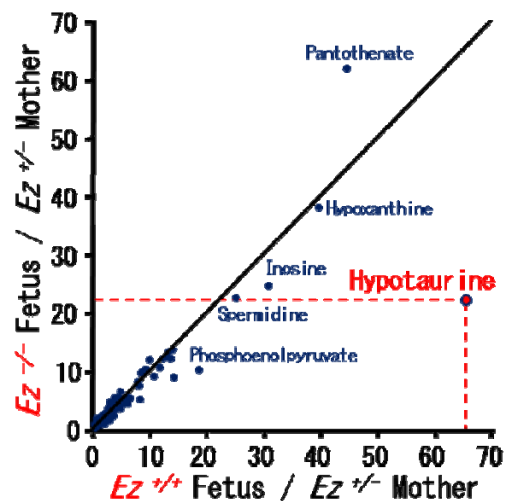


図 1. エズリン欠損マウス胎児のメタボロミクス解析

そこで、胎盤関門のヒポタウリン輸送に関与する分子実体を明らかにするため、ラット胎盤刷子縁膜ベシクルを用いてポタウリン取り込みを解析した。その結果、ヒポタウ

リン取り込みは Na^+ および Cl^- を駆動力とし、 K_m 値 $4.4 \mu\text{M}$ 、 0.1 mM GABA および 2 mM タウリン存在下で顕著に阻害される一方、 0.1 mM タウリンおよび 2 mM ベタインでは阻害されないなど GABA トランスポーター (Slc6a13) との類似性が示唆された。一方、マウス Slc6a13 遺伝子を一過性に発現させた HEK293 細胞を用いて解析を行ったところ、Slc6a13 のヒポタウリン取り込みは、 K_m 値が $10 \mu\text{M}$ 、 0.1 mM GABA および 2 mM タウリンで顕著に阻害されたが 0.1 mM タウリンおよび 2 mM ベタインでは阻害されなかった。RT-PCR およびウエスタンブロット解析の結果、ラットおよびマウス胎盤に Slc6a13 の mRNA およびタンパク質の発現が確認された。マウス胎盤刷子縁膜ベシクルについて抗エズリン抗体を用いた免疫沈降を行ったところ、エズリンとの共沈物に Slc6a13 が確認され、Slc6a13 とエズリンとの相互作用が明らかとなった。さらに、HEK293 細胞に Slc6a13 とエズリンを共発現させた結果、Slc6a13 によるヒポタウリン取り込み活性が有意に上昇した。これらのことから、エズリンは血液胎盤関門を構成する合体性栄養膜細胞の母体血側細胞膜の裏打ちタンパク質として発現し、Slc6a13 を母体血側細胞膜に局在化させ機能調節因子として働くことが示された。血液胎盤関門にエズリンと Slc6a13 がトランスポーター複合体を形成することは、抗酸化作用を有するヒポタウリンを母体から胎盤内および胎児に供給することで酸化ストレスから胎児を保護している可能性が考えられた。

(4) 妊娠マウスに心不全治療薬のジゴキシンを静脈内投与し胎児移行性を検討したところ、エズリンノックアウトマウスにおいて、胎児移行性の増加傾向が見られた。ジゴキシンは ABC トランスポーターの P-糖タンパク質の基質であることから、エズリンが P-糖タンパク質と相互作用する可能性が考えられた。

(5) 胎児移行性が低く妊婦に使用される抗菌薬であるエリスロマイシンを基質としてプロトンと共役して胎児血から母体血方向に効率的に輸送する排出システムが存在すること示した。これまで胎盤関門において物排出輸送系として機能するトランスポーターとしては ATP の加水分解能を利用して細胞内から細胞外への物質輸送を媒介する ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターが知られているが、新規のメカニズムとして興味深い。本輸送系もエズリンによる制御を受けるか否かについては今後の課題である。

(6) エズリンは男性生殖臓器である精巣内における局在性も明らかとなった。

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 14 件)

- ① Lee NY, Sai Y, Nakashima E, Ohtsuki S, Terasaki T, Kang YS. 6-Mercaptopurine transport by equilibrative nucleoside transporters in conditionally immortalized rat syncytiotrophoblast cell lines TR-TBTs. *Pharm Sci* 100(9): (2011), in press 査読有
- ② Nishimura T, Sai Y, Fujii, Muta M, Iizasa H, Tomi M, Kose N, Nakashima E. Roles of TauT and system A in cytoprotection of rat syncytiotrophoblast cell line exposed to hypertonic stress. *Placenta* 31(11):1003-1009 (2010). 査読有
- ③ Sai Y, Nishimura T, Ochi K, Tanaka N, Takagi A, Tomi M, Kose N, Kobayashi Y, Miyakoshi N, Kitagaki S, Mukai C, Nakashima E. Proton-coupled erythromycin antiport at rat blood-placenta barrier. *Drug Metab Dispos* 38(9):1576-1581 (2010). 査読有
- ④ Higuchi K, Iizasa H, Sai Y, Horieya S, Lee K-E, Wada M, Nishimura T, Wakayama T, Tamura A, Tsukita S, Kose N, Kang Y-S, Nakashima E. Differential expression of Ezrin and CLP-36 in two layers of syncytiotrophoblast in rats. *Biol Pharm Bull* 33(8):1400-1406 (2010). 査読有
- ⑤ Wakayama T, Nakata H, Kurobo M, Sai Y, Iseki S. Expression, localization and binding activity of the ezrin/radixin/moesin proteins in the mouse testis. *Histochem Cytochem* 57(4):351-362 (2009). 査読有
- ⑥ Sato K, Sai Y, Nishimura T, Chishu T, Kose N, Nakashima E. Influx mechanism of 2', 3'-dideoxyinosine (ddI) and uridine at the blood-placenta barrier. *Placenta* 30(3):263-269 (2009). 査読有
- ⑦ Nishimura T, Seki Y, Sato K, Chishu T, Kose N, Terasaki T, Kang YS, Sai Y, Nakashima E. Enhancement of zidovudine uptake by dehydroepiandrosterone sulfate in rat syncytiotrophoblast cell line TR-TBT 18d-1. *Drug Metab Dispos* 36(10):2080-2085 (2008). 査読有
- ⑧ Sai Y, Nishimura T, Shimpo S, Chishu T, Sato K, Kose N, Terasaki T, Mukai C, Miyakoshi N, Kang YS, Nakashima E. Characterization of the mechanism of Zidovudine uptake by rat conditionally immortalized syncytiotrophoblast cell line TR-TBT. *Pharm Res* 25(7):1647-1653 (2008). 査読有
- ⑨ Chishu T, Sai Y, Nishimura T, Sato K, Kose N, Nakashima E. Potential of various drugs to

inhibit nucleoside uptake in rat syncytiotrophoblast cell line, TR-TBT 18d-1. *Placenta*. 29(5):461-467 (2008). 査読有

[学会発表] (計 37 件)

- ① 登美齊俊、樋口 慧、西村友宏、若山友彦、田村 淳、月田早智子、曾我朋義、崔 吉道、中島恵美. 胎盤における ezrin の発現と Slc6a13 機能調節因子としての役割. 第 32 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2010 年 11 月 30 日、富山国際会議場 (富山県)
- ② Higuchi K, Nishimura T, Tomi M, Tamura A, Tsukita S, Soga T, Sai Y, Nakashima E. Decreased hypotaurine concentration in fetal plasma and placenta of ezrin knockout mice and Slc6a13/GAT-2-mediated hypotaurine transport in the placenta. FIP Pharmaceutical Sciences 2010 World Congress, 2010 年 11 月 14 日, Morial Convention Center (USA)
- ③ 崔 吉道、西村友宏、越智香織、田中紀章、高木彰紀、登美齊俊、巨勢典子、中島恵美. ラット胎盤関門におけるエリスロマイシンのプロトン共役排出輸送. 第 5 回トランスporter研究会、2010 年 7 月 10 日、東京医科大学 (東京都)
- ④ 樋口 慧、西村友宏、登美齊俊、巨勢典子、崔 吉道、中島恵美. 胎盤 hypotaurine 取り込みにおける GABA トランスporter (Slc6a13) の関与. 第 5 回トランスporter研究会、2010 年 7 月 10 日、東京医科大学 (東京都)
- ⑤ 樋口 慧、西村友宏、登美齊俊、若山友彦、田村 淳、月田早智子、曾我朋義、崔 吉道、中島恵美. Ezrin 欠損マウス胎盤・胎児で減少する hypotaurine の胎盤におけるトランスporter同定、日本薬剤学会第 25 年会、2010 年 5 月 12 日、徳島県郷土文化会館 (徳島県)
- ⑥ 崔 吉道. 薬物胎児移行と胎盤トランスporterの機能制御(招待講演). 第 9 回薬学と臨床セミナー、2010 年 4 月 3 日、大手町サンケイプラザ (東京都)
- ⑦ 樋口 慧、西村友宏、登美齊俊、崔 吉道、中島恵美. GABA 輸送担体(Slc6a13/GAT-2)を介した hypotaurine の胎盤供給機構. 日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 28 日、岡山コンベンションセンター (岡山県)
- ⑧ 崔 吉道. 薬物動態の個人間変動(特別講演). 第 17 回 臨床薬剤師のための講習会、2009 年 7 月 5 日、金沢都ホテル (石川県)
- ⑨ 樋口慧、西村友宏、登美齊俊、若山友彦、田村 淳、月田早智子、曾我朋義、崔 吉道、中島恵美. Ezrin ノックアウトによる胎児血および胎盤中生体物質濃度変化のメタボローム解析. 日本薬剤学会第 24 年会、2009 年 5 月 23 日、静岡県コンベンションアーツセンター (静岡県)
- ⑩ Sai Y, Tanaka N, Takagi A, Ochi K, Nishimura T, Tomi M, Kose N, Nakashima E. H⁺-Coupled efflux transport of erythromycin at the blood-placenta barrier in rats. The 3rd Asian Pacific Regional ISSX Meeting, 2009 年 5 月 11 日, The Imperial Queen's Park Hotel (Thailand)
- ⑪ Sai Y, Takagi A, Ochi K, Nishimura T, Kose N, Nakashima E. H⁺-coupled transport of erythromycin at the blood-placenta barrier in rats. 第 23 回日本薬物動態学会年会、2008 年 10 月 31 日、熊本市民会館 (熊本県)
- ⑫ Sai Y, Takagi A, Ochi K, Kose N, Nishimura T, Nakashima E. Uptake mechanism of erythromycin at the blood-placenta barrier. 68th FIP World Congress of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences (FIP2008), 2008 年 8 月 31 日-9 月 2 日, Congress Center Basel (Switzerland)
- ⑬ Sai Y. Transporter mediated approaches for delivery and avoidance control of drug to organs (Special Lecture). 2nd NRL Symposium on Transporters Targeted Drug Delivery, 2008 年 5 月 26 日, Seoul National University (Korea)
- ⑭ Sai Y, Higuchi K, Sato K, Chishu T, Nishimura T, Nakashima E. Role of transporters on pathophysiological aspect of the blood-placenta barrier (シンポジウム講演). The Pharmaceutical Society of Korea 2008 Spring International Convention, 2008 年 5 月 2 日, International Convention Center Jeju (Korea)

[図書] (計 3 件)

- ① 玉井郁巳、崔 吉道. 細胞膜と膜輸送活性. 生物薬科学実験講座 5、細胞の構造とオルガネラ、大熊勝治/中西義信 編、廣川書店、東京、pp.104-116 (2010)
- ② 寺崎哲也、崔 吉道. SBO68 薬物の胎児への移行について、その機構と血液胎盤関門の意義を説明できる. スタンダード薬学

シリーズ6、薬と疾病、IB. 薬の効くプロセス(2)薬剤(第2版)、第19章分布、日本薬学会編、東京化学同人、東京、pp.57-59(2009).

[その他]

ホームページ等

<http://web.hosp.kanazawa-u.ac.jp/bu/yaku/>

<http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/lab/byouin.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

崔 吉道 (SAI YOSHIMICHI)

金沢大学・附属病院・准教授

研究者番号：40262589

(2) 研究分担者

西村 友宏 (NISHIMURA TOMOHIRO)

慶應義塾大学・薬学部・助教

研究者番号：40453528

(3) 連携研究者

若山 友彦 (WAKAYAMA TOMOHIKO)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：70305100