

機関番号：32612

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20790144

研究課題名 (和文) 妊娠経過に伴う胎盤トロホプラスト細胞における核酸輸送担体と薬物輸送の相互作用

研究課題名 (英文) Interaction of nucleoside transport and drug transport in placental trophoblast cells at various stages of pregnancy

研究代表者

巨勢 典子 (KOSE NORIKO)

慶應義塾大学・薬学部・研究員

研究者番号：60348612

研究成果の概要 (和文)：妊婦への薬物の投与基準は確立されていない。本研究では妊婦への安全で有効な計画的治療法を確立するために、胎盤における薬物と栄養物の輸送機構の相互作用、および病態時における変動を解明することを目的とした。本研究により、胎児の発達に重要である核酸と薬物の輸送との相互作用を明らかにした。更に、妊娠糖尿病時における核酸取り込み輸送機能の変動についても一部解明した。これらの成果は、妊婦への薬物の投与基準確立への応用が期待される。

研究成果の概要 (英文)：Standard methods of drug administration to pregnant woman have not been established. The purpose of this study was to clarify the interactions of nutrient and drug transport mechanisms in the placenta in order to establish safe, effective, and rational treatment methods for pregnant woman. We also aimed to clarify the transport mechanisms of drugs and nutrients in placenta under pathological conditions. As the supply of nucleosides is important for fetal growth, we focused on the interaction of transport mechanisms for drugs and nucleosides in the placenta. The uptake mechanisms of nucleosides in placenta in gestational diabetes was also clarified. These results should be useful for the establishment of standard methods of drug administration for the pregnant woman.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：血液胎盤関門、核酸輸送担体、薬物輸送担体、adenosine、ddI、AZT、ENT

1. 研究開始当初の背景

重度ウイルス感染症で、抗ウイルス薬などの nucleoside analog の投与が必要となる。しかし、現在、妊婦については、有益性が危険性を上回る場合に限り、投与されることとされているのみで、その投与基準は確立していない。本

研究の全体構想は、胎盤における薬物と栄養物の輸送機構の相互作用、および妊娠周期における胎盤関門の継時的変化を明らかにし、現在画一的に避けられている妊婦への安全で有効な妊娠時期を考慮した計画的治療法を確立することである。

胎盤における母体から胎児への nucleoside および nucleobase (以下、nucleoside 類)の供給は胎児の発達に重要である。これまでに、ヒト胎盤灌流やヒト syncytiotrophoblast 刷子縁膜ベシクルによる取り込み実験より、nucleoside 類の母体から胎児への輸送は飽和性であり、核酸トランスポーター(nucleoside transporter (NT))が関与することが示唆されている (Acevedo et al., 1995, Barros et al., 1991)。一方、NT は、抗腫瘍薬や抗ウイルス薬などの nucleoside analog を基質や阻害剤として認識することがわかってきた (Cano-Soldado et al., 2004)。薬物と nucleoside 類輸送との相互作用、またどの程度の濃度で相互作用が引き起こされるかを調べることは重要である。更に、胎児の発育に伴い、胎盤の機能は劇的に変化する。そのため、胎盤の nucleoside 輸送において妊娠時期特異的な胎盤機能の変動に伴う薬物-nucleoside 相互作用を考慮に入れることが重要である。

2. 研究の目的

ラット胎盤トロホブラストの条件的不活化細胞株と妊娠ラットを用いて、核酸トランスポーターの機能的発現と核酸取り込みへの寄与率、薬物と nucleoside 類輸送との相互作用を調べることを目的とした。更に、病態時における nucleoside 類輸送の変動とそれに関与する分子機構としての輸送担体の発現変動の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) TR-TBT 18d-1 (妊娠後期 syncytiotrophoblast モデル)における nucleoside 類取り込みに関与するトランスポーターの推定と、取り込み輸送に対する nucleoside 類似薬物の添加による影響および用量依存的な阻害効果の検討。

① TR-TBT 18d-1 における [³H]uridine 及び [³H]adenosine の取り込みを検討した。

② TR-TBT 18d-1 の [³H]uridine 及び [³H]adenosine 取り込みに対する nucleoside 類似薬物の阻害効果及び濃度依存性を検討した。

③ 抗 HIV 薬の didanosine (ddI) 及び AZT の取り込みについて検討した。

(2) nucleoside 類取り込みと薬物の相互作用に関与する薬物輸送担体の寄与の解析。

① rat ENT1 および ENT2 より cRNA を作成し、アフリカツメガエル卵母細胞に発現させたのち、 [³H]adenosine および [³H]uridine の取り込み輸送特性の解析を行った。

② ENT1, 2 の *in vivo* ラット胎盤での機能を評価するため、妊娠ラットに [³H]adenosine および [¹⁴C]mannitol を静脈内投与し、胎盤への取り込みクリアランスをインテグレーションプ

ロット法により解析した。

(3) 確立した *in vivo* における nucleoside の胎盤取り込みの評価を進展させることを目的とした、nucleoside 類似医薬品の *in vivo* 胎盤取り込みクリアランスの評価。

① [³H]adenosine および抗ウイルス薬である [³H]ddI および [³H]AZT を妊娠ラットに静脈内投与し、胎児胎盤系への取り込みクリアランスをインテグレーションプロット解析により行った。

② 胎盤における ENT1, 2 の機能的発現評価を行った。これまでに ENT1, 2 の基質である adenosine の胎盤細胞における ENT1, 2 を介した取り込み機能と胎盤における顕著な取り込みクリアランスは解明されたが、ENT1, 2 の特異的阻害剤である NBMPR は *in vivo* では毒性のため、阻害活性濃度で使用することができないことが示された。そこで、胎盤における ENT1, 2 の機能評価をするため、胎盤刷子縁膜ベシクルを調製し、*in vivo* における取り込みクリアランスを反映するかを検証し、阻害剤効果により各トランスポーターの機能を明らかにした。

(4) 病態時における胎盤核酸取り込みと ENT 発現の変動を解析した。前項により確立された胎盤核酸取り込み機能評価系を用い、妊娠時における核酸取り込み輸送の変動要因を解明するため、adenosine 輸送の発現変動が推察されている糖尿病時における胎盤の核酸取り込み輸送機能を評価した。同時に胎盤における ENT1, 2 および健常時には寄与の少ない CNT1, 2, 3 の mRNA 発現を解析した。

4. 研究成果

(1) TR-TBT 18d-1 における [³H]uridine 及び [³H]adenosine の取り込みを検討したところ、両者ともに Na⁺非依存性、NBMPR 非感受性及び飽和性であり、ENT1 及び ENT2 が主に寄与することが示唆された。更に、TR-TBT 18d-1 の [³H]uridine 及び [³H]adenosine 取り込みに対する nucleoside 類似薬物の阻害効果及び濃度依存性を検討した。その結果、高濃度の cytarabine, zidovudine (AZT), amantadine, caffeine, nifedipine, vidarabine の添加により、両取り込みへの顕著な阻害効果が認められたが、臨床投与における血漿中遊離型薬物濃度においては阻害が見られなかった。したがって、これらの薬物は、妊婦へ投与された場合に胎児への nucleoside 類供給に影響を与えないと推察された。また、抗 HIV 薬の didanosine (ddI) 及び AZT の取り込みについて検討した結果、ddI には ENT2、AZT には未知のトランスポーターが関与することを明らかにした。

(2) rat ENT1 および ENT2 より cRNA を作成し、アフリカツメガエル卵母細胞に発現させたのち、 ^3H adenosine および ^3H uridine の取込み輸送特性の解析を行った。各基質の取込みは ENT1, 2 発現細胞において顕著に高く、NBMPR は $0.1 \mu\text{M}$ および $100 \mu\text{M}$ で ENT1, 2 をそれぞれほぼ完全に阻害した。 ^3H adenosine 取込みの親和性はそれぞれ $13.6 \mu\text{M}$ および $38.7 \mu\text{M}$ と算出され、胎盤関門モデル TR-TBT 細胞における高親和性輸送と一致していた。またこれらの特性は TR-TBT 細胞と一致しており、TR-TBT 細胞における ENT1, 2 の機能的発現が示された。ENT1, 2 の *in vivo* ラット胎盤での機能を評価するため、妊娠ラットに ^3H adenosine および ^{14}C mannitol を静脈内投与し、胎盤への取込みクリアランスをインテグレーションプロット法により解析した。 ^3H adenosine および ^{14}C mannitol の取込みクリアランスはそれぞれ 0.055 、 $0.011 \text{ mL/min/g placenta}$ であり、adenosine の取込みクリアランスは顕著に高かった。したがって ENT1, 2 の機能的関与が示唆されたが、ENT 阻害剤である NBMPR は *in vivo* においては毒性が強く用いることができないことが示され、胎盤における ENT1, 2 の機能評価には、生理的発現量を維持した膜小胞系による解析が有用であると推察された。

(3) 確立した *in vivo* における nucleoside の胎盤取り込みの評価を進展させるため、 ^3H adenosine および抗ウイルス薬である ^3H ddI および ^3H AZT を妊娠ラットに静脈内投与し、胎児胎盤系への取込みクリアランスをインテグレーションプロット解析により行った。非透過マーカーである ^{14}C mannitol と比較し、 ^3H adenosine および ^3H AZT の取込みは顕著に高かった。一方、 ^3H ddI の取込みは ^{14}C mannitol と同程度であった。したがって胎盤での nucleoside 輸送の重要性および抗ウイルス薬による輸送特性の差が示された。

ラット胎盤刷子縁膜ベシクルを調製し、 ^3H adenosine 取込みは主に NBMPR の感受性および速度論解析から ENT1 および ENT2 で輸送されることが示された。

(4) 妊娠糖尿病時における胎盤の核酸取り込み輸送機能を評価するため、streptozotocin (STZ) を妊娠ラットに投与し病態モデルラットを作製した。胎盤における ENT1, 2 および CNT1, 2, 3 の mRNA 発現を解析したところ、CNT2 の発現が有意に上昇していた。これは病態ラットから作製した胎盤刷子縁膜ベシクルへの ^3H adenosine 輸送における Na^+ 依存性が増加していたこと、また western blot においても CNT2 の発現が上昇していることも観察された。血管収縮性にも関与する

adenosine の妊娠糖尿病での胎盤内動態において、胎児発育不全との関連をさらに解明することが重要である。

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 5 件)

- ① Higuchi K, Kose N, Nakashima E (他 11 名、10 番目). Differential expression of ezrin and CLP36 in the two layers of syncytiotrophoblast in rats. *Biol Pharm Bull.* 33:1400-1406 (2010). (査読有)
- ② Sai Y, Kose N, Nakashima E (他 9 名、7 番目). Proton-coupled erythromycin antiport at rat blood-placenta barrier. *Drug Metab Dispos.* 38:1576-1581 (2010). (査読有)
- ③ Nishimura T, Kose N, Nakashima E (他 6 名、7 番目). Roles of TauT and system A in cytoprotection of rat syncytiotrophoblast cell line exposed to hypertonic stress. *Placenta.* 31:1003-1009 (2010). (査読有)
- ④ Sato K, Kose N, Nakashima E (他 4 名、5 番目). Influx mechanism of 2',3'-dideoxyinosine and uridine at the blood-placenta barrier. *Placenta.* 30:263-269 (2009). (査読有)
- ⑤ Chishu T, Kose N, Nakashima E (他 3 名、4 番目). Potential of various drugs to inhibit nucleoside uptake in rat syncytiotrophoblast cell line, TR-TBT 18d-1. *Placenta.* 29:461-467 (2008). (査読有)

[学会発表] (計 11 件)

- ① 田中 純、西村友宏、登美斉俊、巨勢典子、中島恵美. ステロイド硫酸抱合体による T 細胞へのジドブジン移行標的化. 第 54 回日本薬学会関東支部大会、2010. 10. 2、東京.
- ② 西村友宏、地主拓也、登美斉俊、巨勢典子、中島恵美. 妊娠糖尿病モデルラット胎盤における核酸トランスポーターの発現変動. 第 5 回トランスポーター研究会年会、2010. 7. 10-11、東京.
- ③ 樋口 慧、西村友宏、登美斉俊、巨勢典子、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. 3. 28、岡山.
- ④ Nishimura T, Tomi M, Kose N, Sai Y, Nakashima E. Enhancement of

zidovudine uptake by DHEAS in rat placental syncytiotrophoblasts and human CD4(+) T lymphocytes. Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2009, 2009.10.16, 静岡.

- ⑤ 西村友宏、田中紀章、登美齊俊、巨勢典子、崔 吉道、中島恵美. エリスロマイシンの血液胎盤関門における排出輸送機構の関与. 日本薬学会第24年会、2009.5.21、静岡.
- ⑥ 中村 遼、地主拓也、西村友宏、巨勢典子、崔 吉道、中島恵美. ラット血液-胎盤関門におけるadenosine取り込みにENT4 は関与するか?. 日本薬学会第129年会、2009.3.28、京都.
- ⑦ 中村 遼、地主拓也、西村友宏、巨勢典子、崔 吉道、中島恵美. 血液-胎盤関門でのadenosine取り込みに関するpH依存性輸送の関与. トランスポーター研究会第2回関東部会、2008.12.6、東京.
- ⑧ Sato K, Chishu T, Kose N, Nishimura T, Sai Y, Nakashima E. Involvement of equilibrative nucleoside transporters (ENTs) in the uptakes of uridine and didanosine (ddI) at the blood-placenta barrier. 2008 AAPS Annual Meeting and Exposition, 2008.11.18, Atlanta, GA.
- ⑨ 佐藤和子、地主拓也、巨勢典子、西村友宏、崔 吉道、中島恵美. 血液-胎盤関門での2', 3'-dideoxyinosine (ddI) 取り込みに関するENT2 の関与. 第3回トランスポーター研究会、2008.6.8、京都.
- ⑩ Sato K, Sai Y, Nishimura T, Kose N, Nakashima E. 2', 3'-Dideoxyinosine (ddI) and uridine share an equilibrative nucleoside transporter (ENT2) on these uptakes at the blood-placenta barrier (BPB). 2nd Asia Pacific ISSX Meeting 2008, 2008.5.13, Shanghai, China.
- ⑪ Chishu T, Nishimura T, Kose N, Sai Y, Nakashima E. Identification of equilibrative nucleoside transporters involving nucleoside and nucleobase uptakes in rat placental cell line, TR-TBT 18d-1. 2nd Asia Pacific ISSX Meeting 2008, 2008.5.13, Shanghai, China.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

巨勢 典子 (KOSE NORIKO)
慶應義塾大学・薬学部・研究員
研究者番号：60348612

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし