

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21489

研究課題名（和文）胎盤エクソソームのウイルス型膜融合を介した妊婦薬物動態の統合制御

研究課題名（英文）Regulation of pharmacokinetics during pregnancy by placental exosomes

研究代表者

登美 斉俊（Tomi, Masatoshi）

慶應義塾大学・薬学部（芝共立）・教授

研究者番号：30334717

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：胎盤特異的に発現するsyncytin-2は膜融合能を持ち、合胞体化による関門形成に関与する。胎盤モデル細胞由来エクソソームの肝モデル細胞への取り込みは、細胞でのsyncytin-2発現を誘導することで上昇した。エクソソームを添加した肝モデル細胞における胎盤特異的miRNAの発現も検出され、syncytin-2発現はエクソソームによる細胞間情報伝達に寄与すると考えられた。ただし、syncytin-2受容体であるMFSD2Aのマウス肝臓での発現が絶食時のみであることも示され、関与は限定的である可能性がある。MFSD2Aは、胎児へのドコサヘキサエン酸の供給を担うことも示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Syncytin-2は胎盤特異的に発現する分子であり、本研究では本分子を発現する胎盤細胞由来のエクソソームが細胞間の情報伝達の促進に貢献する可能性を示す結果を得ることができた。妊娠期における胎盤から母体への情報発信メカニズムを新たに提唱する先駆的結果である。ただし、受容体となるMFSD2Aの発現細胞は限られており、血液脳関門には発現していることが確認できた一方で、肝臓においては恒常的に発現していないことも明らかとなった。妊娠期における薬物代謝の変動に本メカニズムが関与している可能性については、慎重な評価が必要である。

研究成果の概要（英文）：Syncytin-2, a molecule specifically expressed in the placenta, has membrane fusion capacities and contributes to the barrier formation through syncytialization. In this study, it is indicated that the uptake of JEG-3 cell-derived exosome to human hepatic HepG2 cells was significantly enhanced when the expression of syncytin-2 in JEG-3 cells was induced. The placenta-specific miRNA is detected from HepG2 cells exposed to JEG-3 cell-derived exosomes, implying that exosomal syncytin-2 is capable to mediate cell-to-cell communication through the exosome. However, the expression of MFSD2A, a receptor of syncytin-2, is found not to be constitutively expressed in the mouse liver. Therefore, it is necessary to further confirm whether syncytin-2-expressing exosome is preferably binds to hepatic cells. We also found that MFSD2A involves in the supply of docosahexaenoic acid to the fetus.

研究分野：薬物動態学

キーワード：胎盤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

妊婦への薬物治療を妨げる要因は、妊婦・胎児における薬物動態・毒性が不透明であり、特に妊娠進行に伴う薬物動態の経時的変動を個別評価できない点にある。妊婦では CYP3A4 基質であるミダゾラムのクリアランスが 90%増加すると報告されているが、その変動は妊娠進行に伴って経時的に変化するため、一律ではない。本課題を克服するには、妊娠に伴う薬物動態変動を規定する機構を解明することが必要である。妊娠時機能変動の原因を、妊娠時特有の臓器である胎盤と考えることは合理的である。従来、胎盤由来のプロゲステロンなどが、肝 CYP の発現を誘導すると考えられてきたが、申請者は、胎盤から母体血に分泌されるエクソソームに着目した。エクソソームは細胞から細胞へと受け渡され、内包されたマイクロ RNA(miRNA)は受け取った細胞の遺伝子発現に影響を与える。胎盤関門の実体である合胞体栄養膜細胞から分泌されるエクソソームの膜には、胎盤関門特異的分子である Syncytin が埋め込まれているため、他にはない膜融合特性を持つ。Syncytin は、ウイルス外壁が宿主細胞膜と融合して侵入する際に使われるレトロウイルス遺伝子が、ヒトゲノムに内在化したものである。Syncytin-1 および 2 は、それぞれ膜タンパクである ASCT2 および MFSD2A を受容体として相手細胞膜に結合し、膜融合を開始させる。胎盤関門は、Syncytin が細胞同士を融合させて間隙を消失させることで形成されている。胎盤エクソソームの場合は、Syncytin を持つことで、ASCT2 を高発現する細胞や、Mfsd2a を高発現する肝細胞や血液脳関門などを認識できる可能性はある。特に、肝細胞との細胞間情報伝達は、薬物動態に深くかわり、重要である。

胎盤エクソソームは約 90 種の胎盤特異的 miRNA を内包する。胎盤特異的 miRNA 群は当然、非妊娠時には存在せず、その存在が鋭敏な影響を与えうる。胎盤特異的 miRNA のゲノム配列は、14 番染色体(C14)あるいは 19 番染色体(C19)上に miRNA クラスター(MC)として存在する。このうち C19MC は、霊長類特異的であり、動物種差が大きい妊娠過程において、霊長類での機能制御を説明できる miRNA として注目を集めている。薬物動態も種差が大きく、C19MC が役割を果たす可能性が十分にある。

2. 研究の目的

本研究では、胎盤から分泌されるエクソソームが、Syncytin-2 を介した膜融合によって肝細胞に取り込まれることを明らかにするとともに、肝薬物代謝酵素やトランスポーター発現に及ぼす胎盤エクソソーム中 miRNA の影響を分子機構として解析することを目的とした。

3. 研究の方法

ヒト絨毛がん由来 JEG-3 細胞へのエクソソーム取り込み実験：

胎盤細胞モデルとして用いられる JEG-3 細胞を forskolin 存在下あるいは非存在下で培養し、エクソソームを回収する 48 時間前に抗生物質含有無血清培地に交換した。48 時間後、Total Exosome Isolation/From Cell Culture Media (Invitrogen) を用いてエクソソームを抽出した。抽出したエクソソームは、western blot 法によるマーカータンパク CD63 の発現解析、および動的散乱光法による粒子径および粒度分布解析で評価した。

ヒト肝がん由来 HepG2 細胞へのエクソソーム取り込み実験：

エクソソームを PKH67 で蛍光標識し、HepG2 細胞に添加後、細胞内の蛍光強度測定 (Ex. 490nm, Em. 510nm)、あるいは蛍光顕微鏡を用いた観察によりエクソソーム取り込み量を評価した。

実験動物：

MFSD2A ノックアウトマウス、あるいはヘテロ欠損マウス雌雄を掛け合わせて得た MFSD2A ノックアウトマウス胎仔胎盤を使用した。遺伝子型は genotyping により同定した。

MFSD2A タンパク発現量解析：

マウス MFSD2A の抗原ペプチドを免疫したモルモットから得た抗血清から抗マウス MFSD2 抗体を精製した。マウス胎盤脱落膜、着床連結帯、および迷路部、脳組織から精製した毛細血管、および肝細胞の細胞膜画分における MFSD2A タンパク発現量を Western blot により定量した。LPC-DHA の MFSD2A KO マウスにおける胎仔移行性評価：

妊娠 14.5 日目のマウスに LPC-[¹⁴C]DHA を尾静脈投与し、18 時間後の母体血漿、胎仔血漿、迷路部、胎仔脳、および胎仔肝臓を可溶化し、液体シンチレーションカウンターで測定した。

4. 研究成果

JEG-3 細胞の培養上清から抽出したエクソソームにおいて、エクソソームマーカーである CD63 の発現を western blot によって解析したところ、エクソソーム画分において CD63 の強い発現が示され、エクソソームの精製が確認できた。また、JEG-3 細胞由来エクソソームの粒子径は、およそ 100 nm であった。さらに、JEG-3 細胞の培養上清から抽出したエクソソームが HepG2 細胞に取り込まれたことを確認するため、JEG-3 細胞由来の胎盤特異的 miRNA である miR-517a-3p 発現量を定量した。JEG-3 細胞由来のエクソソームを添加することで、HepG2

細胞において miR-517a-3p の発現が検出された。以上の結果より、胎盤のモデル細胞である JEG-3 細胞の胎盤特異的 miRNA である miR-517a-3p はエクソソームを介して肝臓のモデル細胞である HepG2 細胞に導入されることが示された。

JEG-3 細胞由来のエクソソーム添加による HepG2 細胞薬物代謝酵素 mRNA 発現への影響を評価するために CYP1A2、CYP2C9、CYP2D6、及び CYP3A4 の mRNA 発現量を定量した。JEG-3 細胞由来のエクソソームを添加することで CYP1A2 と CYP3A4 はいずれも約 2.5 倍に上昇した一方(図 1)、CYP2C9 および CYP2D6 の発現は半分程度に低下した。以上の結果より、JEG-3 細胞由来のエクソソームは HepG2 細胞における薬物代謝酵素発現を調節出来ることが示唆された。特に、CYP3A4 mRNA の発現上昇は、妊娠期間中に報告されている CYP3A4 代謝活性の上昇と一致した。また、一連の解析を通じて、エクソソームを介した胎盤 - 肝臓細胞間コミュニケーションの存在が示唆された。

JEG-3 細胞における Syncytin-2 mRNA 発現は、PKA 活性化剤である forskolin を添加した 48 時間後、8 倍に増加した。HepG2 細胞への JEG-3 細胞由来エクソソーム取り込み量は、forskolin 存在下で培養した細胞由来のエクソソームにおいて高いことが示され、Syncytin-2 がエクソソームの細胞膜への融合に関与している可能性が示された。

Syncytin-2 が膜融合する際に結合する受容体は MFSD2A であるが、ヒト HepG2 細胞において western blot で発現を行った結果、MFSD2A の発現が示された。Syncytin-2 が融合可能な組織および細胞を明確にするため、マウス各臓器における MFSD2A 発現について解析した。解析のため、新たに抗マウス MFSD2A 抗体をモルモットで作製した。作製した抗体を用いて western blot を行った結果、マウス胎盤迷路部および脳毛細血管の細胞膜画分において 75kDa にバンドが示された一方、そのバンドは MFSD2A ノックアウトマウスで消失していた。作製したマウス MFSD2A 抗体の特異性が示されたため肝臓における解析を行ったところ、肝臓には通常発現せず、24 時間絶食時においてのみ発現が誘導され、バンドが検出されることが明らかとなった(図 2)。このような発現変動は、胎盤迷路部や血液脳関門では示されなかった。以上の結果から、肝臓における MFSD2A の発現が恒常的ではないことが明らかとなった。

合胞体栄養膜細胞を含む迷路部における MFSD2A タンパクの発現量は妊娠進行に伴って上昇し、妊娠 15.5 日目において最も高く、その後は減少していくことが示された。また、妊娠 15.5 日目マウス胎盤における MFSD2A タンパクの発現は、脱着膜と比較して着床連結帯および迷路部において高く、さらに細胞質画分と比較して細胞膜画分に高く発現していた。以上から、マウス胎盤における MFSD2A タンパクは、妊娠中期の胎盤迷路部の細胞膜に高発現していることが示された MFSD2A は血液脳関門に発現し、リゾホスファチジルコリン(LPC)などのエステルとして存在するドコサヘキサエン酸(DHA)を血液から脳組織へ輸送する輸送体であることが知られている。マウス胎盤に発現する MFSD2A が、母胎間の LPC-DHA 輸送に関与するか明らかにするため、MFSD2A KO マウス胎仔胎盤への LPC-[¹⁴C]DHA の移行を評価した。その結果、MFSD2A KO マウスにおける LPC-[¹⁴C]DHA の胎仔血漿 / 母体血漿比および迷路部 / 母体血漿比は、野性型マウスと比較していずれも低下する傾向が示された。以上の結果から、胎盤 MFSD2A は母体から胎仔への DHA 移行に一部関与することも示唆された。

以上の結果から、胎盤モデル細胞由来エクソソームの肝モデル細胞への取り込みは、細胞での Syncytin-2 発現を誘導することで上昇し、エクソソームを添加した肝モデル細胞における胎盤特異的 miRNA の発現も検出され、Syncytin-2 発現はエクソソームによる細胞間情報伝達に寄与すると考えられた。ただし、Syncytin-2 受容体である MFSD2A のマウス肝臓での発現が絶食時のみであることも示され、関与は限定的である可能性がある。一方、MFSD2A の胎盤における役割として、胎児へのドコサヘキサエン酸の供給を担うことも示唆された。

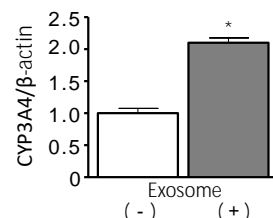


図 1 JEG-3 由来胎盤エクソソームが HepG2 細胞における CYP3A4 mRNA 発現量を増加させる

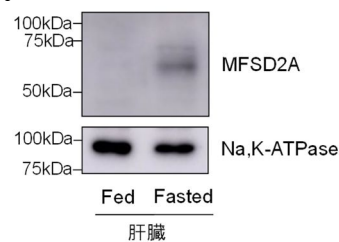


図 2 マウス肝臓における MFSD2A 発現に対する絶食の影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Noguchi Saki, Takagi Akinori, Tanaka Takahiro, Takahashi Yu, Pan Xiaole, Kibayashi Yuka, Mizokami Ryo, Nishimura Tomohiro, Tomi Masatoshi	4. 巻 42
2. 論文標題 Fluorouracil uptake in triple negative breast cancer cells: Negligible contribution of equilibrative nucleoside transporters 1 and 2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biopharmaceutics & Drug Disposition	6. 最初と最後の頁 85 ~ 93
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bdd.2261	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Pan Xiaole, Noguchi Saki, Ando Misuzu, Nishimura Tomohiro, Tomi Masatoshi	4. 巻 545
2. 論文標題 MicroRNA-126 suppresses the invasion of trophoblast-model JEG-3 cells by targeting LIN28A	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 132 ~ 137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.01.077	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 登美 斉俊, 野口 幸希, 西村 友宏
2. 発表標題 ヒト胎盤透過性の定量予測に向けたアプローチ
3. 学会等名 第61回日本先天異常学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomi M, Nomura T, Noguchi S, Nishimura T
2. 発表標題 Effect of maternofetal albumin concentration gradient on species differences in fetal drug transfer
3. 学会等名 International Federation of Placenta Associations (IFPA) 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 関 誠悟, 山本 元輝, 赤沼 伸乙, 定村 龍太, 野口 幸希, 河野 早弥賀, 盛武 浩, 細谷 健一, 西村 友宏, 登美 斉俊
2. 発表標題 マウス胎盤におけるオメガ3脂肪酸輸送体Mfsd2aの発現解析
3. 学会等名 第45回日本女性栄養・代謝学会学術集会・第10回日本DOHaD学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomi M
2. 発表標題 Placental control of fetal drug transfer
3. 学会等名 The 1st International Conference on Pharmaceutical Sciences and Military Pharmacy (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野口 幸希, 潘 晁楽, 安藤 美鈴, 西村 友宏, 登美 斉俊
2. 発表標題 LIN28A発現抑制を介したmiR-126によるJEG-3細胞の浸潤抑制
3. 学会等名 第29回日本胎盤学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋 駿太, 稲垣 舞, 野口 幸希, 西村 友宏, 登美 斉俊
2. 発表標題 マウス胎盤におけるPGE2受容体の発現解析
3. 学会等名 第29回日本胎盤学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 登美 斉俊, 野口 幸希, 西村 友宏
2. 発表標題 関門としての胎盤：薬物透過制御機構とその種差
3. 学会等名 第47回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 登美 斉俊, 野口 幸希, 西村 友宏
2. 発表標題 薬物の胎盤透過を規定するメカニズムとその影響
3. 学会等名 第60回日本先天異常学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	石川 源 (Gen Ishikawa) (20287767)	東北大学・医学部・非常勤講師 (11301)	
研究分担者	野口 幸希 (Saki Noguchi) (10803661)	慶應義塾大学・薬学部（芝共立）・助教 (32612)	
研究分担者	西村 友宏 (Tomohro Nishimura) (40453518)	慶應義塾大学・薬学部（芝共立）・准教授 (32612)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------