

機関番号：12601  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21790518  
 研究課題名（和文） アニオン性薬物のヒト胎盤透過に関わる分子機構の解明  
 研究課題名（英文） Molecular mechanisms involved in human transplacental transport of anionic drug  
 研究代表者  
 佐藤 宏樹（SATO HIROKI）  
 東京大学・大学院薬学系研究科・助教  
 研究者番号：80451855

研究成果の概要（和文）：ヒト胎盤より単離したトロホプラスト細胞における非ステロイド性消炎鎮痛薬（NSAIDs）の輸送はトランスポーターを介しており、少なくとも一部はモノカルボン酸トランスポーター（MCTs）が関与していることが示唆された。さらに、単離トロホプラスト細胞を用いた経細胞輸送実験系を確立した。構築した経細胞輸送実験系は、薬物の経胎盤輸送を *in vitro* においてより簡便に予測できるツールとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The transport of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in trophoblast cells isolated from human placenta was suggested to be mediated by carrier(s), and be attributed, at least in part, to monocarboxylate transporter (MCTs). The transcellular transport of NSAIDs was examined by using isolated trophoblast cells for the first time. The present experimental system is suggested to be a potential tool to easily predict the transplacental transport of drugs *in vitro*.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：薬物胎盤透過、アニオン性薬物、トランスポーター、非ステロイド性消炎鎮痛薬、トロホプラスト細胞

## 1. 研究開始当初の背景

妊娠初期における胎児への薬物暴露は胎児死亡や奇形を誘発することがあり、妊娠中期・後期における胎児への薬物暴露も、場合によっては致死的な結果を招くことがある。

一方で、妊娠中に疾患治療のため薬物療法を受けなければならない妊婦が少なからず存在することも事実である。しかし、臨床で使用されているほとんどの医薬品は、妊婦に投与した場合の胎児に対する安全性は保証されていない。したがって、医薬品の胎児毒性を評

価することは、創薬、医薬品適正使用などの場面においてきわめて重要な課題である。

妊娠初期の催奇形性は、動物を用いた催奇形性試験などにより、創薬段階においてある程度のスクリーニングがルーチンに行われているのに対し、妊娠中期以降の妊婦に対する薬物投与のリスクを定量的に評価するための方法論は、いまだに構築されていない。このリスクを評価する一つの指標は、薬物の胎児への移行性である。母体に投与された薬物は、母体血から胎盤を介して胎児血中へと移行することから、薬物の胎児移行性を評価する上で、胎盤透過性の評価が必須となる。

胎盤の構造や機能には顕著な種差があり、胎盤透過性の評価にはヒト胎盤を用いることが重要である。ヒト胎盤試料を用いた研究として、胎盤灌流実験法を用いた研究が行われている。その中で、胎児への薬物移行が単純拡散では説明できないほど高いまたは低い例や、胎児血中の親水性化合物（内因性化合物の代謝物等）が母体血中に速やかに排出される例が見いだされており、胎盤におけるトランスポーターの存在が推測されるが、その分子の実態はほとんど明らかとなっていなかった。

## 2. 研究の目的

血液-胎盤関門は、母体血と胎児血の間に存在するトロホプラスト細胞が担っているとされる。このトロホプラスト細胞のモデル細胞として、ヒト絨毛癌細胞由来の BeWo 細胞や JAR 細胞が広く使用されている。しかし、両者は癌細胞由来の不死化細胞であり、*in vivo* での物質輸送プロファイルが反映されているとは限らない。そのため、正常ヒト胎盤組織を用いることが最適であり、ヒト胎盤から単離・調製した膜ベシクルを用いた検討では、胎盤を介した薬物移行にトランスポーターが関与している可能性が示唆されている。一方で、より *in vivo* に近い機能特性を保持すると考えられる単離トロホプラスト細胞を用いた薬物輸送に関する研究はほとんど行われていない。

そこで本研究では、ヒト単離トロホプラスト細胞を用い、特にアニオン性薬物である非ステロイド性消炎鎮痛薬 (NSAIDs) に焦点を当て、胎盤における薬物輸送を担う分子の実体を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究は東京大学医学部倫理委員会および東京大学薬学部倫理委員会による承認を受けて行った。

### (1) サイトトロホプラスト細胞の単離

サイトトロホプラスト細胞は、Kliman ら (Endocrinology. 188:1567-1582, 1986) の報告に改良を加えて単離した。すなわち、帝王切開により得られたヒト正常満期胎盤を脱血後、母体側の絨毛組織を採取し、0.125% Trypsin、1.2 U/mL DispaseII、300 KU/mL DNaseI を含む digestion buffer により消化後、消化液を回収した。その後、Percoll gradient により精製し、単離サイトトロホプラスト細胞を得た。

### (2) 初代培養トロホプラスト細胞での取り込み実験

単離トロホプラスト細胞をコラーゲンIでコートしたマルチウェルプレートに播種し、M199 培地で4日間培養後、常法に従い取り込み実験を行った。基質として、放射標識した [<sup>3</sup>H]サリチル酸、[<sup>3</sup>H]ケトプロフェン、[<sup>3</sup>H]イブプロフェン、[<sup>3</sup>H]アンチピリン、[<sup>14</sup>C]ジクロフェナクを用いた。また、阻害剤として phloretin、 $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamate (CHC)、L-lactic acid、probenecid、benzyl penicillin、*p*-aminohippuric acid (PAH)、sulfobromophthalein (BPS)、rifampicin、estron-3-sulfateを用いた阻害実験を行った。

### (3) MCTs 発現確認

単離トロホプラスト細胞、BeWo 細胞、Jar 細胞、JEG-3 細胞から total RNA を抽出し、RT-PCR 法により、モノカルボン酸トランスポーター (MCTs) mRNA の発現を確認した。

### (4) 単離トロホプラスト細胞のトランスウェル上での培養

単離トロホプラスト細胞をヒトコラーゲンIでコートしたトランスウェルインサート (0.9 cm<sup>2</sup>、0.4  $\mu$ m) に播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub>/95% 大気下、10 ng/mL EGF、10  $\mu$ M SB203580 を添加したM199 培地で、経上皮電気抵抗値 (TEER) が定常状態 (>350 ohms $\cdot$ cm<sup>2</sup>) に達するまで培養した。その後、培地からSB203580を除いて3日間培養後、常法に従い経細胞輸送実験を行った。

(5) 初代培養トロホプラスト細胞における経細胞輸送実験

インサートメンブレン上に培養したトロホプラスト細胞を用いて、常法に従い、経細胞輸送実験を行った。基質として放射標識した<sup>3</sup>Hサリチル酸、<sup>3</sup>Hイブプロフェン、<sup>3</sup>Hケトプロフェン、<sup>14</sup>Cジクロフェナク、<sup>3</sup>Hアンチピリンをdonor側に添加し、receiver側に透過した薬物量を経時的に測定した。なお、<sup>14</sup>C D-mannitolまたは<sup>3</sup>H D-mannitolを用いて、傍細胞輸送および細胞外容積を測定した。

(6) 経細胞輸送の速度論的解析

経細胞輸送実験によって得られたデータを、apical、cell、basolateralの3コンパートメントからなるモデル(式[I]~[III])により解析した。

$$\frac{d(X_a/C_0)}{dt} = -CL_{a>c} \cdot \frac{X_a/C_0}{V_a} + k_{c>a} \cdot \frac{X_c}{C_0} \quad [I]$$

$$\frac{d(X_b/C_0)}{dt} = -CL_{b>c} \cdot \frac{X_b/C_0}{V_b} + k_{c>b} \cdot \frac{X_c}{C_0} \quad [II]$$

$$\frac{d(X_c/C_0)}{dt} = CL_{a>c} \cdot \frac{X_a/C_0}{V_a} + CL_{b>c} \cdot \frac{X_b/C_0}{V_b} - (k_{c>a} + k_{c>b}) \cdot \frac{X_c}{C_0} \quad [III]$$

ここで、 $X_a$ 、 $X_b$ および $X_c$ はそれぞれapical、basolateralおよびcellコンパートメント中の薬物量、 $CL_{a>c}$ および $CL_{b>c}$ はそれぞれapicalからcellおよびbasolateralからcellコンパートメントへのinflux clearance、 $k_{c>a}$ および $k_{c>b}$ はそれぞれcellからapicalおよびcellからbasolateralコンパートメントへの排出速度定数、 $V_a$ および $V_b$ はそれぞれapicalおよびbasolateralコンパートメントの容積、 $C_0$ はdonor側の初期薬物濃度を示す。

4. 研究成果

(1) トロホプラスト細胞の単離

トロホプラスト細胞マーカーであるcytokeratin7陽性細胞の割合から算出した単離トロホプラスト細胞の純度は $90.8 \pm 1.1\%$ であった。単離したトロホプラスト細胞は、培養4日目には、単核の細胞が凝集、融合、多核化し、シンシチオトロホプラスト細胞様の形態となった。

(2) 初代培養トロホプラスト細胞によるNSAIDs取り込み

初代培養トロホプラスト細胞におけるサリチル酸、ケトプロフェン、イブプロフェンの取り込みは時間経過とともに増加し、細胞外pHの低下に伴い増加した。また、高濃度で

飽和性を示し、 $K_m$ 値はそれぞれ211、62.2、152  $\mu\text{M}$ と算出された(図1)。

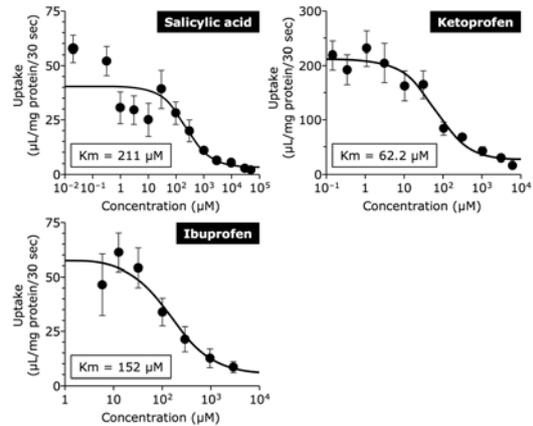


図1. 初代培養トロホプラスト細胞によるNSAIDsの取り込み

初代培養トロホプラスト細胞によるサリチル酸およびイブプロフェンのpH 5.5における初期取り込みは、プロトンフォアであるFCCPおよびイオノフォアであるnigericinによって有意に低下し、ケトプロフェンにおいても低下する傾向が認められた。これらのことから、シンシチオ化トロホプラスト細胞へのNSAIDs(サリチル酸、ケトプロフェン、イブプロフェン)の取り込みはプロトン勾配依存的、濃度依存的であることが示唆された。

さらに、モノカルボン酸トランスポーター(MCTs)、有機イオントランスポーター(OATs)、有機アニオントランスポーター(OATPs)の基質や阻害剤が各NSAIDsの取り込みに及ぼす影響を検討したところ、L-lactic acid(MCTs基質)およびprobenecid(MCTs、OATs阻害剤)によって阻害されたが、CHC(一部MCTsの典型的阻害剤)やOATs、OATPsの基質・阻害剤(benzyl penicillin、PAH、BPS、rifampicin、estron-3-sulfate)によっては阻害されなかった。したがって、シンシチオ化トロホプラスト細胞へのNSAIDsの取り込みの少なくとも一部にMCTsが関与していることが示唆された。

(3) 初代培養トロホプラスト細胞におけるMCTs mRNAの発現

初代培養トロホプラスト細胞において、MCT1、4、5、6、7、8、10、12、13のmRNAの発現がRT-PCRにより確認された。したがって、シンシチオ化トロホプラスト細胞へのNSAIDsの取り込みの少なくとも一部に上記MCTsが関与していることが示唆された。なお、ヒト絨毛癌由来細胞株(BeWo、JAr、

JEG-3 細胞) では、初代培養細胞と MCTs mRNA の発現プロファイルが異なっていた。

#### (4) ヒト初代培養トロホブラスト細胞による経細胞輸送系の構築

トランスウェルインサート上に、10  $\mu\text{M}$  SB203580 (MAPK 阻害剤) および 10 ng/mL EGF を含む培地で単離トロホブラスト細胞を培養したところ、TEER 値が 2~3 週間で定常状態に達した ( $>350 \text{ ohms}\cdot\text{cm}^2$ )。経細胞輸送実験を行ったところ、サリチル酸の透過クリアランスはbasolateral-to-apicalよりもapical-to-basolateralの方向が大きく、イブプロフェン、ジクロフェナク、アンチピリンではapical-to-basolateralよりもbasolateral-to-apicalの方向が大きく、輸送の方向性が認められた (図 2)。また、いずれのNSAIDsの透過クリアランスもmannitolの透過クリアランスよりも大きかった。以上より、トロホブラスト細胞を用いた経細胞輸送実験系を確立できたと考えられた。

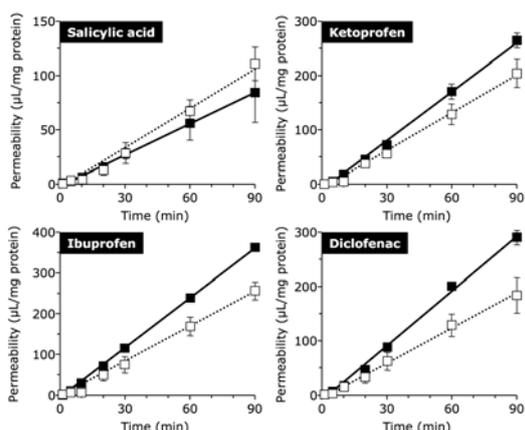


図 2. 初代培養トロホブラスト細胞による NSAIDs の経細胞輸送

□; apical-to-basolateral  
■; basolateral-to-apical

#### (5) ヒト初代培養トロホブラスト細胞経細胞輸送系による NSAIDs 輸送の速度論的解析

経細胞輸送実験の結果について、各NSAIDsの経細胞輸送を速度論的に解析し、経細胞輸送パラメータ $CL_{a>c}$ 、 $k_{c>a}$ 、 $k_{c>b}$ 、 $CL_{b>c}$ を求めたところ、既報の*in situ*ヒト胎盤灌流法で得られた経胎盤動態パラメータ $K_1'$ 、 $k_2$ 、 $k_3$ 、 $K_4'$ とそれぞれ正の相関が認められた (それぞれ $r=0.874$  [ $p=0.053$ ]、 $r=0.906$  [ $p=0.034$ ]、 $r=0.884$  [ $p=0.116$ ]、 $r=0.976$  [ $p=0.024$ ])。

#### (6) まとめ

ヒト胎盤より単離したトロホブラスト細胞

の初代培養系における NSAIDs (サリチル酸、ケトプロフェン、イブプロフェン) の輸送はトランスポーターを介していることが示唆され、少なくとも一部には MCTs が関与している可能性が考えられた。さらに、トランスウェル上に MAPK 阻害薬および EGF を用いて培養することで、トロホブラスト細胞を用いた経細胞輸送実験系を世界で初めて確立した。構築した経細胞輸送実験系を用い、NSAIDsのトロホブラスト細胞透過過程を速度論的に解析し、得られた経細胞パラメータは、過去に*in situ*胎盤灌流実験により求めた経胎盤動態パラメータと類似していた。本研究で構築したトロホブラスト細胞を用いた経細胞輸送実験系は、薬物の経胎盤輸送を*in vitro*でより簡便に予測できるツールとなる可能性が示唆された。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

- 阿波圭介、佐藤宏樹、他、ヒト初代培養トロホブラスト細胞によるNSAIDsの胎児移行性の速度論的評価、日本薬学会第131年会、2011年3月30日、静岡
- 阿波圭介、佐藤宏樹、他、ヒト初代培養トロホブラスト細胞におけるNSAIDsの輸送解析、日本薬学会第130年会、2010年3月28日、岡山

[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]

なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 宏樹 (SATO HIROKI)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号：80451855

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし