

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560063

研究課題名(和文) 妊娠期食生活に応じたメチル基供与体の胎児移行機構制御とエピゲノム変動

研究課題名(英文) Fetal transfer mechanism of methyl donors across the placenta and its epigenomes

研究代表者

登美 斉俊 (Tomi, Masatoshi)

慶應義塾大学・薬学部・准教授

研究者番号：30334717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：メチル基供与体のトランスポーターを介した胎盤透過を解析した結果、メチオニンを輸送するLAT1はラット胎盤の刷子縁膜に高発現し、アミノ酸を胎児に供給する役割を果たすことが示された。LAT1で輸送されるメチオニンと比較し、メチルテトラヒドロ葉酸やベタインの胎盤透過性は低い。そのため、胎盤透過性の観点からはメチオニンによる胎児へのメチル基供給を重視すべきと考えられた。また、ベタインの胎盤透過機構については、種差に注意すべきである。胎盤に発現するABCG2について、プロモーター領域におけるメチル化レベルは低いことが示された。

研究成果の概要(英文)：We aimed to examine the fetal transfer mechanism of methyl donors, such as methionine, 5-methyltetrahydrofolate (MTHF), and betaine, across the placenta. LAT1, a transporter for methionine, was observed to be specifically localized at the brush-border membrane of rat placental syncytiotrophoblast layer I, suggesting the role of LAT1 in the fetal transfer of amino acids. Fetal transfer rate of 5-methyltetrahydrofolate (MTHF) and betaine appears to be low compared with methionine transported by LAT1, implying the importance of methionine in terms of placental permeability. SNAT2 mediates the transfer of betaine, and its functional expression in placental brush-border membrane was found to be detected in rat but not in human. This suggests the presence of the species difference in betaine transport. Methylated CpG level in the promoter region of the Abcg2 gene was observed to be very low.

研究分野：食生活学

キーワード：胎盤関門 トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病胎児期プログラミング説は「生活習慣病は栄養環境ストレスにより胎児期に素因が形成され、その後の生活習慣での負荷により発症する」とする学説であり、多くの疫学調査によって裏付けられ、妊娠期食生活の重要性を示す根拠となっている。胎児プログラミングを生み出す分子機構は、栄養環境ストレスに対応する胎児内エピゲノム状態の変化である。そして、エピゲノム状態の変化として最も知られているのは DNA のメチル化であり、ヒストンメチル化やアセチル化も深く関与している。生体内でのメチル基供与体は活性型メチオニンとも呼ばれる S-アデノシルメチオニンであるが、加えてその前駆体であるメチオニン、メチオニンにメチル基を付加するメチルテトラヒドロ葉酸、ベタインも広義でのメチル基供与体に含まれる。食事からのメチル基供与体の摂取量が胎児エピゲノム状態を規定することは知られており、妊娠中は葉酸摂取が強く勧められる。一方、申請者は胎内で利用可能な栄養物質量は直接的には胎盤トランスポーターが規定することに着目した。胎盤は、栄養環境ストレスに対応して胎児への効率的なエピジェネティックな刷り込みを行うために、あるいは栄養環境ストレスによる胎児へのエピジェネティックな悪影響を避けるために、メチル基供与体の供給制御を行っている可能性がある。

妊娠動物にメチオニン、葉酸、ベタインといったメチル基供与体を与えることで、多くの場合、将来の生活習慣病リスクが低減する方向で、胎児にエピジェネティックな変化をもたらすことは知られている。しかし、多くの研究では、葉酸を重視する傾向にあるものの、メチル基供与体の種類はあまり考慮に入れていない。適切なメチル基供与体を選択する上で、胎児内のメチオニン回路の回転効率を上げるという視点は当然重要であるが、胎児にとって吸収・代謝・排泄臓器の役割を果たす胎盤の透過性を選択基準に入れるのは合理的である。

2. 研究の目的

メチル基供与体であるメチオニン、メチルテトラヒドロ葉酸やベタインについて、それらの胎盤透過を制御するトランスポーター発現・機能制御機構を明らかにするとともに、トランスポーター活性制御がエピゲノム状態に与える影響を明らかにする。胎盤透過性を考慮した栄養摂取による、胎児への効率的メチル基供給戦略を立案することを目指す。

3. 研究の方法

本研究は慶應義塾大学薬学部倫理委員会および医学部倫理委員会に研究計画書を提出し、その内容が承認されたものである(薬学部: 承 120709-1, 医学部: 2011-250-2)。胎盤透過性解析: 麻酔下で妊娠ラットを開腹

し、放射標識した被験化合物と対照であるアンチピリンとの混合液を腹部大動脈下部に急速投与し、10 秒後に子宮頸に最も近い側の胎児を摘出し放射活性を測定した。

胎盤刷子縁膜ベシクルの調製と評価: ヒト満期胎盤および妊娠ラット胎盤の絨毛組織ホモジネートから分画遠心法を用いて粗膜画分を調製した。粗膜画分からマグネシウム沈降法を用いて刷子縁膜画分を精製した。

細胞・ベシクルを用いた輸送実験: 細胞あるいはベシクルを、放射標識した被験化合物を含む緩衝液と一定時間インキュベートした後、細胞・ベシクル内の放射活性を測定した。免疫染色: 妊娠ラットから摘出した胎盤を paraformaldehyde で固定し、凍結胎盤切片を作製した。切片を抗体とインキュベーションして蛍光染色し、共焦点顕微鏡で観察した。メチル化解析: ゲノム DNA を抽出し、バイサルファイト処理により、非メチル化シトシンをウラシルに変換した。変換後の DNA の塩基配列を解析することで、プロモーター領域中の CpG 配列におけるシトシンメチル化レベルを評価した。

4. 研究成果

メチルテトラヒドロ葉酸(MTHF)の母体から胎児への移行性を妊娠ラットにおいて評価した。その結果、アンチピリンの約 10%と低いものの、水溶性の非透過性マーカーであるイヌリンと比較して高いことが示された。ラット胎盤 trophoblast モデル細胞株である TR-TBT18d-1 細胞における MTHF の取り込み量は 20 分まで経時的に増加し、また非標識 1mM MTHF 存在下で有意に減少した。MTHF 取り込みは proton-coupled folate transporter の阻害剤である 1mM sulfobromophthalein や reduced folate carrier の阻害剤である 1mM thiamine monophosphate 存在下では阻害されなかった。さらに folate receptor alpha (FR α)機能を抑制する 0.8 U/ μ L phosphatidylinositol-specific phospholipase C で前処理した条件でも、取り込み活性に有意な変動は示されなかった。以上から、TR-TBT18d-1 細胞における MTHF の輸送は既知の葉酸トランスポーターとは異なる輸送体を介して行われていることが示唆された。

ベタインの母体から胎児への移行性を妊娠ラットにおいて評価した結果、アンチピリンの約 10%と低いものの、イヌリンと比較して高いことが示された。ヒト胎盤刷子縁膜ベシクルにおけるベタインの取り込みは時間依存的に増加し、非標識ベタインによって有意に阻害されたことから担体介在性が示唆された。TR-TBT 18d-1 細胞におけるベタインの取り込みは、非標識ベタインおよびアミノ酸輸送システム A の特異的基質であるメチルアミノイソ酪酸(MeAIB)によって有意に阻害された一方、betaine/GABA transporter (BGT)-1 の基質である GABA では阻害されな

かった。システム A トランスポーターである SNAT1, 2, および 4 について、いずれもベタインに対する基質認識性についての報告がない。そのため、ヒトおよびラット SNAT1, 2, および 4 の一過性発現細胞における、ベタインの取り込み活性を解析した。ヒトおよびラット SNAT2 発現細胞におけるベタイン取り込みは経時的に増加し、mock 細胞より有意に高いことが示された。一方、SNAT1 および 4 を介したベタイン輸送は検出されなかった。システム A の典型的な基質の取り込み活性については、SNAT1, 2, および 4 発現細胞いずれにおいても mock 細胞より有意に高かった。以上から、システム A トランスポーターのうち、SNAT2 のみがベタインを基質とすることが明らかとなった。

ベタイン輸送を担うシステム A 輸送系について、胎盤関門母体側細胞膜における機能発現を定量的に明らかにするため、ヒトおよびラット胎盤刷子縁膜ベシクルを用いた解析を行った。ヒトおよびラット胎盤刷子縁膜ベシクルへの MeAIB 取り込みは、Na⁺非存在下および非標識 MeAIB 存在下で約 1/3 に減少したため、刷子縁膜ベシクルへの Na⁺依存性 MeAIB 取り込み輸送は、ほぼシステム A を介したものであると示唆された。ヒト刷子縁膜ベシクルへの MeAIB 取り込みは 5 mM アルギニン感受性が示された一方、10 mM ベタインでは変化しなかった。ラット刷子縁膜ベシクルでは、10 mM ベタイン存在下で MeAIB 取り込みが低下した一方、5 mM アルギニンでは減少しなかった。以上から、ヒト胎盤刷子縁膜におけるシステム A を介した MeAIB 輸送には SNAT1 および 4 が関与する一方、ラットでは SNAT1 および 2 が関与することが示唆された。そのため、ベタインを基質とする SNAT2 の胎盤における機能発現には種差が存在することが示唆された。

メチオニン輸送を担うシステム L 輸送系は胎盤において輸送活性が高いことが知られている。一方で、システム L トランスポーターである LAT1 および LAT2 について、ラット胎盤のどの部分に発現しているか、報告はない。ラット胎盤における発現局在を免疫染色法で解析した結果、LAT1 はラット胎盤関門を構成する二層の syncytiotrophoblast 層のうち、母体側層の刷子縁膜において CD98 とともに局在していることが明らかとなった。LAT は CD98 とヘテロ二量体を形成することでアミノ酸輸送活性を示す。そのため、LAT1 と CD98 は、母体側層の刷子縁膜における母体血からのメチオニン取り込み輸送において、重要な役割を担っているものと考えられる。一方、LAT2 に関しては胎盤における明確な発現シグナルが得られなかった。LAT1 基質の胎盤透過性を比較評価した結果、基質の中でも胎盤透過性の高いアミノ酸と非透過性マーカーと同程度の基質があることが明らかとなった。これは胎児側細胞膜における膜透過機構の違いによるものであると考

えられる。LAT1 を介したメチオニンを含むアミノ酸の胎盤透過性は非常に高いと考えられるものの、母体側細胞膜だけでなく胎児側細胞膜における輸送機構にも着目すべきであることが示唆された。

葉酸代謝拮抗薬であるメトトレキサートの細胞内からの排出に關与する ABC トランスポーター、ABCG2 に着目し、メチル化レベルを解析した。ABCG2 プロモーター近位領域(-146~+36)における 25 個の CpG site について、メチル化レベルを解析したところ、平均メチル化率は 6.4%と低いことが示された。つまり、TR-TBT 18d-1 細胞における Abcg2 プロモーター領域は既に脱メチル化されており、エピジェネティックな制御による Abcg2 発現誘導の可能性は低いことが示唆された。

結論として、比較評価したメチル基供与体のうち、メチオニンを輸送する LAT1 は胎盤の母体側刷子縁膜に高発現し、アミノ酸を胎児側に供給する役割を果たしていることが示された。LAT1 で輸送されるメチオニンと比較すると、メチルテトラヒドロ葉酸やベタインの胎盤透過性は低いと考えられる。そのため、胎盤透過性の観点からはメチオニンによる胎児へのメチル基供給を重視すべきであるといえる。特にベタインを基質とする SNAT2 に関しては、ラット胎盤刷子縁膜において機能発現が示された一方、ヒト胎盤刷子縁膜での機能は検出されず、種差に注意すべきである。胎盤に発現する ABCG2 について、プロモーターにおけるメチル化レベルは低いことが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

(1) Tomi M, Eguchi H, Ozaki M, Tawara T, Nishimura S, Higuchi K, Maruyama T, Nishimura T, Nakashima E. Role of OAT4 in uptake of estriol precursor 16 α -hydroxy dehydroepiandrosterone sulfate into human placental syncytiotrophoblasts from fetus. *Endocrinology*. 査読有, 印刷中.

DOI: 10.1210/en.2015-1130.

(2) Noguchi S, Nishimura T, Fujibayashi A, Maruyama T, Tomi M, Nakashima E. Organic anion transporter 4-mediated transport of olmesartan at basal plasma membrane of human placental barrier. *J Pharm Sci*. 査読有, 印刷中. DOI: 10.1002/jps.24434.

(3) Nishimura T, Duereh M, Sugita Y, Yoshida Y, Higuchi K, Tomi M, Nakashima E. Protective effect of hypotaurine against oxidative stress-induced cytotoxicity in rat placental trophoblasts. *Placenta*. 査読有, 36(6), 2015, 693-698. DOI: 10.1016/j.placenta.2015.02.014.

(4) Tomi M, Miyata Y, Noguchi S, Nishimura S,

Nishimura T, Nakashima E. Role of protein kinase A in regulating steroid sulfate uptake for estrogen production in human placental choriocarcinoma cells. *Placenta*. 査読有, 35(8), 2014, 658-660.
DOI: 10.1016/j.placenta.2014.06.003.

(5) Nishimura T, Yagi R, Usuda M, Oda K, Yamazaki M, Suda S, Takahashi Y, Okazaki F, Sai Y, Higuchi K, Maruyama T, Tomi M, Nakashima E. System A amino acid transporter SNAT2 shows subtype-specific affinity for betaine and hyperosmotic inducibility in placental trophoblasts. *Biochim Biophys Acta*. 査読有, 1838(5), 2014, 1306-1312.
DOI: 10.1016/j.bbamem.2014.01.004.

〔学会発表〕(計 1 1 件)

(1) 登美斉俊, 西村友宏, 中島恵美. ヒト胎盤関門トランスポーターによる胎児防御機構と薬物輸送制御, 2015年3月25-28日, 神戸.

(2) Takahashi Y, Nishimura T, Suda S, Tomi M, Nakashima E. Respective contribution of system A subtypes to neutral amino acid transport at the placental microvillous membrane. 19th North American ISSX Meeting and 29th JSSX Annual Meeting, 2014年10月19-23日, San Francisco, USA.

(3) Tomi M, Eguchi H, Nishimura T, Maruyama T, Nakashima E. Uptake mechanism of an estradiol precursor, 16 α -hydroxy dehydroepiandrosterone sulfate, at the basal plasma membrane of human term placenta. International Federation of Placenta Associations 2014, 2014年9月9-12日, Paris, France.

(4) 登美斉俊, 西村友宏, 中島恵美. 薬物の胎児移行における胎盤トランスポーターのインパクト. 第30回日本DDS学会学術集会, 2014年7月30-31日, 東京.

(5) 登美斉俊, 西村友宏, 中島恵美. 薬物胎児移行支配要因としての胎盤トランスポーター. 医療薬学フォーラム2014・第22回クリニカルファーマシーシンポジウム, 2014年6月28-29日, 東京.

(6) 高橋優, 西村友宏, 須田沙也加, 登美斉俊, 中島恵美. 胎盤刷子縁膜中性アミノ酸輸送における System A サブタイプ別寄与率の評価. 日本薬学会第29年会, 2014年5月20-22日, 大宮.

(7) 登美斉俊. 薬物胎児移行性の支配要因となるヒト胎盤トランスポーターの同定と定量評価. 日本薬学会第134年会, 2014年3月27-30日, 熊本.

(8) Tomi M, Nishimura T, Nakashima E. The impact of placental transporters in creating the dynamic maternal-fetal interface. Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2013, 2013年11月20-22日, Jeju, Republic of Korea.

(9) Eguchi H, Nishimura T, Usuda M, Suda S, Tomi M, Nakashima E. System A amino acid transporter SNAT2 shows subtype-specific affinity for betaine. Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2013, 2013年11月20-22日, Jeju, Republic of Korea.

(10) Eguchi H, Nishimura T, Usuda M, Suda S, Tomi M, Nakashima E. SNAT2-specific transport function of betaine among amino acid transport system A subtypes. International Federation of Placenta Associations 2013, 2013年9月11-14日, Whistler, Canada.

(11) 登美斉俊, 小澤英輝, 佐野雄一郎, 勝部彬, 西村友宏, 中島恵美. Fetal uptake index (FUI)法を用いた水溶性生体内物質のラット胎盤関門透過性の評価. 第8回トランスポーター研究会, 2013年6月15-16日, 熊本.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

登美 斉俊 (TOMI MASATOSHI)

慶應義塾大学・薬学部・准教授

研究者番号：30334717

(2) 研究分担者

西村 友宏 (NISHIMURA TOMOHIRO)

慶應義塾大学・薬学部・専任講師

研究者番号：40453518

(3) 連携研究者

なし