

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26282028

研究課題名(和文) ヒト胎盤透過速度プロファイルに基づく合理的な妊娠期食事設計戦略

研究課題名(英文) Food guide for pregnant women based on placental permeability of ingredients

研究代表者

登美 斉俊 (Tomi, Masatoshi)

慶應義塾大学・薬学部・教授

研究者番号：30334717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト胎盤関門頂端膜におけるグルコース、乳酸、ヌクレオシド、アミノ酸などのトランスポータータンパク発現量を明らかにした。ラット胎盤における同様の解析から得たタンパク発現量と、実測した胎盤透過速度を比較したところ、トランスポーター基質の高い胎盤透過性は示されたものの、タンパク発現量からの精密な透過速度予測に課題が残った。げっ歯類胎盤におけるABCトランスポーター発現は、母体血に接する胎盤関門第一層ではなく、第二層の頂端膜であることを明らかにした。つまり、ラット胎盤透過速度の予測精度向上には、一層で構成されるヒト胎盤関門とは異なり、二層の細胞層をつなぐ細胞膜を介した透過速度も考慮する必要がある。

研究成果の概要(英文)：We have clarified the protein expression level of nutrient transporters at the brush-border membrane of the human placental barrier formed by single syncytiotrophoblast layer. We have also clarified the protein expression in rat placental barrier formed by double syncytiotrophoblast layers, for estimating placental permeability of transporter substrates across the rat placenta. The higher placental permeability of transporter substrates was observed, however, the estimated permeability was not highly consistent with the measured permeability. There have been thought that two syncytiotrophoblast layers in rodents act functionally as a single layer, but this appears not to be true since we found that MDR1 and BCRP transporters are localized in the second syncytiotrophoblast layer. We need to consider the presence of transporters in the second syncytiotrophoblast layer for estimating placental permeability.

研究分野：食生活学、薬物動態学

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

生活習慣病を予防するには、発症要因を最小化するために発症前から積極的に取り組む必要がある。生活習慣病胎児期プログラミング説は「生活習慣病は胎児期の栄養環境ストレスにより要因が形成され、その後の生活習慣での負荷により発症する」とする学説である(Science 2004, 305:1733-1736)。一方、妊娠糖尿病発症時等における胎児期高栄養への暴露も、出生児の将来における生活習慣病発症リスクを増大させる。妊娠糖尿病の発症頻度は現在約 3%であるが、高年出産はそのリスクを上昇させるため、今後の増加が予想される。よって、妊娠時食生活の制御によって母体への過剰な栄養は避けつつ、適切量の栄養を確実に胎児に供給し、胎児が生活習慣病予備軍となる因子を抑えることは重要である。

食生活と体内栄養環境との関係を考える上で、消化管吸収性が重要であることは論をまたない。同様に、胎児栄養環境を制御するには、胎盤関門による胎児移行性制御によって胎児が母体とは異なる恒常性環境にある点を重視すべきである。代表者らは母体血と胎児血におけるメタボローム解析を行い、胎児血中ビタミンB5濃度が母体血の約50倍であることなど、胎児血中濃度が母体とは大きく異なる物質を数多く見出している。また、Igf2 胎盤特異的欠損による胎盤栄養供給機能の低下が、出生マウスの成長後における不安心理の拡大など中枢機能に深く影響するとの報告(Nature Commun 2013, 4:2311)は、代表者の論点を強く支持している。しかし、胎児移行性情報が不足している現状では、胎盤関門機能を活用した合理的な胎児環境改善戦略は生まれ得ない。

### 2. 研究の目的

本研究では、胎児が利用可能な栄養物質量を胎盤関門が規定することに着目し、定量的・網羅的な解析から胎盤関門透過性を予測し、胎児栄養環境を可視化することで、妊娠期食事設計とその個別化に必要な基盤を構築することを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究は慶應義塾大学薬学部人を対象とする研究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。

胎盤細胞膜画分の調製: ヒト満期およびラット妊娠 19 日目の胎盤絨毛組織ホモジネートから粗膜画分を調製した。さらに Mg<sup>2+</sup>沈降法を用いて刷子縁膜画分と粗基底細胞画分に分離し、ヒト粗基底細胞画分からはスクロース密度勾配遠心で基底細胞画分を精製した。

タンパク絶対発現量の評価: 調製した各細胞膜画分の trypsin 消化物を LC-MS/MS に injection し、胎盤トランスポータータンパ

ク絶対発現量を測定した。

単分子輸送活性の算出: アフリカツメガエル卵母細胞にトランスポーターcRNA を導入した。3 日後にスクロース密度勾配遠心法を用いて細胞膜画分を回収し、タンパク絶対発現量を測定した。同時に、卵母細胞を <sup>3</sup>H 標識された被験化合物とインキュベートし、一定時間経過後の細胞内放射活性を測定した。胎盤透過性の評価: <sup>3</sup>H 標識された被験化合物を標準化合物として用いた [<sup>14</sup>C]antipyrine と共に妊娠 19 日目ラットの腹部大動脈下部に急速投与し、10 秒後に胎児を摘出した。胎児中被験化合物と antipyrine の放射活性比を投与液中放射活性比で除したものを、FUI 値として算出した。

局在解析: 胎盤合体栄養膜細胞における Mdr1b mRNA の局在はマーカー遺伝子との二重 in situ hybridization 法、MDR1 および BCRP タンパクの局在はマーカータンパクとの二重免疫染色法により解析した。染色画像は Image J を用いてシグナル間の距離を測定した。

### 4. 研究成果

ヒト胎盤刷子縁膜(母体側)画分および基底細胞膜(胎児側)画分における栄養物質トランスポータータンパク絶対発現量を網羅的に定量した。その結果、刷子縁膜画分における発現量の高いトランスポーター上位5種として、順に SLC2A1、SLC29A1、SLC1A5、SLC16A1、SLC6A6 が同定された。特にグルコース供給を担う SLC2A1 の発現量は最も高く、410 fmol/μg protein であった。なお、上位5種いずれのトランスポーターの発現量についても、刷子縁膜における発現量が基底細胞膜と比較して低いことが示され、栄養物質の胎盤関門透過の律速段階は刷子縁膜と考え、まずは刷子縁膜における解析を更に進めた。

ラット胎盤刷子縁膜においても、SLC2A1 および SLC16A1 が高く発現することが示された。ヌクレオシドを幅広く基質とする SLC29A1 の発現量は 2.9 fmol/μg protein とヒト胎盤に比べて低く、一方でヒト胎盤では発現が検出されなかった SLC29A2 がラットにおいては検出され(1.0 fmol/μg protein)、同じ基質を複数のトランスポーターで分担して輸送していることが示唆された。ヒト胎盤刷子縁膜においても、必須中性アミノ酸輸送を担うトランスポーターとして、少なくとも SLC7A5 と SLC7A8 の発現が検出され、さらに、SLC7A8 の発現分子数が SLC7A5 に対して優位であることが示された。さらに、小型中性アミノ酸輸送を担うトランスポーターの場合も、SLC38A1、SLC38A2、および SLC38A4 の発現が検出され、そのうち、SLC38A1 の発現分子数が SLC38A2 および SLC38A4 に対して優位であることが示された。以上の結果は、同じ基質を複数のトランスポーターで分担して輸送される例が多いことを示唆しており、該当する基質の透過性を予測するにはそれぞれの

輸送活性を再構築して合算する必要があることを意味している。

タンパク絶対発現量の高かった SLC2A1 の輸送活性を評価するため、3-O-methyl-D-glucose のラット胎盤透過性を評価した。その結果、胎盤透過性の指標である fetal uptake index (FUI) 値が 66% となり、細胞間隙透過マーカーとして知られる inulin carboxyl (3.3%) や sucrose (10%) と比較して著しい高いことが示され、SLC2A1 の高発現が機能的にも裏付けられた。同様に、ヌクレオシドを幅広く基質とする SLC29A1 について、その基質のうち生体内ヌクレオシドである uridine および thymidine、そして異物基質である didanosine (ddI) および ribavirin のラット胎盤透過性を評価した。その結果、FUI 値が各々 37%、75%、37%、および 21% となり、細胞間隙透過マーカーの FUI 値と比較して大きいことが示された。

ラット胎盤刷子縁膜における SLC29A トランスポーターを介したヌクレオシド類の輸送活性を、*in vitro* データから再構築可能かどうか検証を行った。具体的には、ラット胎盤刷子縁膜にタンパクが発現する SLC29A1 および SLC29A2 について、各トランスポーター発現卵母細胞における取り込みクリアランスと細胞膜画分における絶対発現量から算出される単分子輸送活性と、ラット胎盤刷子縁膜画分における各トランスポータータンパク発現量の積を *in vitro* から推定した透過速度とし、*in vivo* での実測値 (FUI 値) と比較した。その結果、ラット胎盤刷子縁膜の SLC29A1 および SLC29A2 を介した uridine、thymidine、didanosine (ddI)、および ribavirin の輸送活性は、各々 31、29、2.5、および 120  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$  protein と算出された。再構築された輸送活性と胎盤透過性の指標である FUI 値の間の相関性は低かったため、ラット胎盤透過を制御する他の細胞膜および胎盤閉門細胞内における代謝の影響等を考慮に入れた輸送活性再構築の必要性が示唆された。

胎盤透過を制御する他の細胞膜の影響を明らかにする上で、一層の合胞体栄養膜細胞層で構成されるヒト胎盤とは異なる、げっ歯類胎盤閉門特有の二層の合胞体栄養膜細胞層に着目した。これまでは二層の合胞体栄養膜細胞層がギャップ結合で連結しているために、ヒト胎盤と同様に一層の胎盤閉門として扱うとされてきた。二層の合胞体栄養膜細胞層におけるトランスポーター局在を明らかにする上で、マウス胎盤における排出トランスポーター MDR1 および BCRP に着目し、局在解析を行った。その結果、Mdr1b mRNA 由来のシグナルは、妊娠 15.5 日目マウス胎盤において迷路帯の合胞体栄養膜細胞層において強く観察された。一方、Bcrp mRNA については、迷路帯においてより広汎なシグナルが観察された。マウス Mdr1b mRNA 由来のシグナルは、合胞体栄養膜細胞第一層 (母体側層)

マーカーである Syncytin-A のシグナルとは重ならず、合胞体栄養膜細胞第二層 (胎児側層) マーカーである Syncytin-B とは大部分において重なった。そのため、Mdr1b は合胞体栄養膜細胞第二層に発現することが示された。ラットおよびマウス胎盤 SynT における MDR1 および BCRP タンパクのシグナルは、第一層頂端膜および第二層基底細胞膜に局在する glucose transporter (GLUT) 1 による 2 本のシグナルの間に検出され、さらに二層の合胞体栄養膜細胞を gap junction で結合する connexin (Cx) 26 シグナルの胎児側に沿って重なって検出された。母体血・胎児血間の蛍光シグナル測定曲線下面積を二等分する線は、Cx26 に対して MDR1 および BCRP がそれぞれ 290 nm および 40 nm 胎児側に位置していた。また、ラット胎盤合胞体栄養膜細胞においても、マウスと同様の MDR1 および BCRP の局在が確認された。つまり、げっ歯類胎盤において、MDR1 および BCRP タンパクは母体血に接する合胞体栄養膜細胞第一層ではなく、第二層の頂端膜に局在することが示された。

本研究を通じて、胎盤透過性の決定因子となるトランスポーターについて、どの栄養物質トランスポータータンパクの発現量が高いのか、定量的に示すことができた。一方、胎盤刷子縁膜におけるトランスポータータンパク発現量から、胎盤透過速度を予測することを試みたが、少なくともヌクレオシド透過については予測に限界があることが示された。ただし、本研究を通じ、ラット胎盤閉門における二層の合胞体栄養膜細胞層を見かけ上一層としてとらえるべきではなく、物質透過においてそれぞれ独自の役割を有していると考えられるべきであることが明確化された。タンパク発現分子数を基準としたラット胎盤透過速度の推定には、二層の合胞体栄養膜細胞層をつなぐ細胞膜における透過速度も含めて考える必要がある。

## 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9件)

(1) Noguchi S, Nishimura T, Mukaida S, Benet LZ, Nakashima E, Tomi M. Cellular uptake of levocetirizine by organic anion transporter 4. J Pharm Sci. 査読有, 印刷中. DOI: 10.1016/j.xphs.2017.03.026.

(2) Inagaki M, Nishimura T, Akanuma S, Nakanishi T, Tachikawa M, Tamai I, Hosoya K, Nakashima E, Tomi M. Co-localization of microsomal prostaglandin E synthase-1 with cyclooxygenase-1 in layer II of murine placental syncytiotrophoblasts. Placenta. 査読有, 53, 2017, 76-82. DOI: 10.1016/j.placenta.2017.04.002.

(3) Takagi A, Nishimura T, Akashi T, Tomi M, Nakashima E. Contribution of equilibrative nucleoside transporter (ENT) 2 to fluorouracil transport in rat placental trophoblast cells. Drug Metab Pharmacokinet. 査読有, 32(2), 2017, 151-156. DOI: 10.1016/j.dmpk.2016.12.001.

(4) Takahashi Y, Nishimura T, Maruyama T, Tomi M, Nakashima E. Contributions of system A subtypes to -methylaminoisobutyric acid uptake by placental microvillous membranes of human and rat. Amino Acids. 査読有, 49(4), 2017, 795-803. DOI: 10.1007/s00726-017-2384-7.

(5) Akashi T, Nishimura T, Takaki Y, Takahashi M, Shin BC, Tomi M, Nakashima E. Layer II of placental syncytiotrophoblasts expresses MDR1 and BCRP at the apical membrane in rodents. Reprod Toxicol. 査読有, 65, 2016, 375-381. DOI: 10.1016/j.reprotox.2016.09.002.

(6) 登美齊俊. 胎児移行性の低い薬物について教えてください. 月刊薬事. 査読無, 58(4), 2016, 666-669.

(7) 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 -hydroxydehydroepiandrosterone sulfate into human placental syncytiotrophoblasts from fetus. Endocrinology. 査読有, 156(7), 2015, 2704-2712. DOI: 10.1210/en.2015-1130.

(8) 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, 104(9), 2015, 3128-3135. DOI: 10.1002/jps.24434.

(9) 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

〔学会発表〕(計 15 件)

(1) 登美齊俊、明石知也、高木良也、中島恵美、西村友宏. げっ歯類合胞体栄養膜細胞層における MDR1 および BCRP の局在. 第 24 回

日本胎盤学会学術集会, 2016 年 11 月 25-26 日, ホテルアバローム紀の国(和歌山県・和歌山市).

(2) 稲垣舞、西村友宏、中西猛夫、島田紘明、赤沼伸乙、立川正憲、細谷健一、玉井郁巳、中島恵美、登美齊俊. マウス胎盤内プロスタグランジン PGE2 分解に果たす輸送体の役割. 日本薬物動態学会第 31 年会, 2016 年 10 月 13-15 日, キッセイ文化ホール(長野県・松本市).

(3) 古郡加奈子、野口幸希、篠原裕美、阿部真希子、西村友宏、中島恵美、登美齊俊. ヒト OAT4 (SLC22A11) 遺伝子の胎盤特異的転写開始点の同定と転写活性に及ぼす影響. 日本薬物動態学会第 31 年会, 2016 年 10 月 13-15 日, キッセイ文化ホール(長野県・松本市).

(4) Takahashi Y, Nishimura T, Maruyama T, Nakashima E, Tomi M. SNAT1 predominantly contributes to system A function in placental microvillous membranes. International Federation of Placenta Associations(IFPA) 2016, 2016 年 9 月 13-16 日, Portland (USA).

(5) Inagaki M, Nishimura T, Nakanishi T, Akanuma S, Tachikawa M, Tamai I, Hosoya K, Nakashima E, Tomi M. Expression and function of prostaglandin transporter in the murine placenta. International Federation of Placenta Associations(IFPA) 2016, 2016 年 9 月 13-16 日, Portland(USA).

(6) Tomi M, Noguchi S, Fujibayashi A, Maruyama T, Nakashima E, Nishimura T. Role of organic anion transporter 4 on the transport of olmesartan across the basal plasma membrane of human placental syncytiotrophoblast. International Federation of Placenta Associations(IFPA) 2016, 2016 年 9 月 13-16 日, Portland(USA).

(7) Akashi T, Nishimura T, Asada T, Ozawa H, Sano Y, Katsube A, Tomi M, Nakashima E. Evaluation of materno-fetal permeability of various compounds by fetus uptake index (FUI) method. Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2015, 2015 年 11 月 25-27 日, Bangkok (Thailand).

(8) 野口幸希、西村友宏、登美齊俊、中島恵美. ヒト胎盤関門有機アニオントランスポーターが薬物胎児移行性に与える影響. 日本薬物動態学会第 30 年会, 2015 年 11 月 12-14 日, タワーホール船堀(東京都・江戸川区).

(9) 登美斉俊. 関門トランスポーターによる薬物組織分布制御機構の研究, 日本薬剤学会第30年会, 2015年5月21-23日, 長崎ブリックホール(長崎県・長崎市).

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

(10) 登美斉俊. 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, 日本薬学会第135年会, 2015年3月25-28日, 神戸学院大学(兵庫県・神戸市).

(3) 連携研究者  
なし

(11) Tomi M, Eguchi H, Nishimura T, Maruyama T, Nakashima E. Characterization of 16 $\alpha$ -hydroxy dehydroepiandrosterone sulfate transport in human placental basal plasma membrane vesicles. 19th North American ISSX Meeting / 29th JSSX meeting, 2014年10月19-23日, San Francisco (USA).

(4) 研究協力者  
なし

(12) 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, 慶應義塾大学薬学部(東京都・港区).

(13) 登美斉俊. 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ーシンポジウム, 2014年6月28-29日, 慶應義塾大学薬学部(東京都・港区).

(14) 登美斉俊, 江口拡美, 丸山哲夫, 西村友宏, 中島恵美. ヒト妊娠期エストリオール合成における胎盤基底細胞膜 OAT4 の関与. 第9回トランスポーター研究会年会, 2014年6月14-15日, 名古屋市立大学大学院薬学研究科(愛知県・名古屋市).

(15) 野口幸希, 登美斉俊, 西村友宏, 中島恵美. 有機アニオントランスポーターOAT4によるolmesartan輸送. 第9回トランスポーター研究会年会, 2014年6月14-15日, 名古屋市立大学大学院薬学研究科(愛知県・名古屋市).

## 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・教授  
研究者番号: 30334717

### (2) 研究分担者

丸山 哲夫 (MARUYAMA TETSUO)  
慶應義塾大学・医学部・准教授  
研究者番号: 10209702

牟田 真理子 (MUTA MARIKO)  
帝京平成大学・健康メディカル学部・准教授  
研究者番号: 40445193