

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03183

研究課題名(和文)トリプトファンバランスに着目した食事による胎児成長支援戦略の構築

研究課題名(英文)Significance of a balanced tryptophan diet for supporting fetal growth

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) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：トリプトファン(Trp)胎児供給機構とその役割を明確にするため、胎盤におけるTrpトランスporterや、食事に伴う血中アミノ酸濃度変化が胎児移行に及ぼす影響を解析した。Trp胎児移行に関与すると考えられるLAT1について、胎盤関門での発現量や局在を明らかにするとともに、その基質組織移行は血中LAT1基質アミノ酸濃度上昇によって阻害されることを示した。OCTN1は妊娠後期の胎盤関門に発現し、Trpから合成されるセロトニンを輸送することも示した。一方、食事中Trpバランスの変化が血中濃度に及ぼす影響は乏しく、これは複数のTrp輸送系が並列に機能している消化管吸収機構を反映していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胎児へのトリプトファン(Trp)輸送だけでなく、セロトニン輸送に関与するトランスporterを解明したことは、胎児環境決定因子を同定できたという点で学術的意義は大きい。また、血中におけるLAT基質アミノ酸の総量に対する一つの基質の存在比率が、当該基質のLAT支配臓器への移行に影響することは示された一方、食事中Trp存在比率の変化が血中アミノ酸組成に与える影響は小さいことが示された。アミノ酸サプリメントには特定のアミノ酸のみを摂取するものもあり、LAT基質アミノ酸の過剰摂取が胎児へのTrp供給に与える影響が限定的であることを総合的に示した本研究は、社会的に重要な意味を持つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present study was to clarify the transporters mediating the fetal transfer of tryptophan and examine the importance of an adequate supply of tryptophan into the fetus. This study described the amount and localization of LAT1 protein, a transporter for large neutral amino acids including tryptophan, at the placental barrier. It is also observed that the tissue distribution of LAT1 substrate is suppressed by an increase of LAT1-substrate amino acids in the plasma. For serotonin, we have clarified OCTN1 protein accepts it as a substrate and is expressed at the placental barrier at term. However, the effect of tryptophan imbalance in the diet was negligible in the plasma concentration of amino acids.

研究分野：食生活学、薬物動態学

キーワード：アミノ酸トランスporter 胎盤関門

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

トリプトファン(Trp)は必須アミノ酸として食事から摂取する必要があり、その代謝産物も胎児成長において重要である。Indoleamine 2,3-dioxygenase によって Trp から産生されるキヌレインは、細胞障害性 T 細胞の抑制や制御性 T 細胞の誘導を介して局所免疫寛容状態を作り出し、胎盤と胎児を母体免疫による拒絶から保護する。Trp から tryptophan hydroxylase 等を介して産生されるセロトニンも、細胞分化誘導により神経回路形成に関与することで、胎児脳の成熟に中心的役割を果たす。そのため、胎児期におけるセロトニンシグナル異常は、出生後の行動や情動の発現様式に影響を及ぼし、自閉症スペクトラム障害との関連など長期的影響が報告されている。つまり、妊婦に対し、食事を通じて必須アミノ酸である Trp を適切に供給することは、その代謝産物であるキヌレインおよびセロトニンの産生を通じて、胎児の適切な成長と、疾病素因の形成を防ぐ重要な意味を持つ。母体から胎盤へのトリプトファン(Trp)供給は、Trp から生合成されるキヌレインやセロトニンがそれぞれ免疫寛容や中枢神経発達に関与するため、胎児にとって重要である。ただし、胎盤への Trp 取り込みを担うと考えられるトランスポーター、LAT を介した輸送はほぼ血中のアミノ酸によって飽和した状態にある。そのため、理論上、胎盤への Trp 供給量は血中 Trp 濃度の絶対値ではなく、LAT 基質アミノ酸総濃度に対する Trp 濃度の割合(Trp インデックス)による影響を強く受ける。そのため、胎盤における Trp やその合成産物であるセロトニンの胎児移行を担うトランスポーターを定量的に解析し、その発現制御機構を明らかにするとともに、食事に伴う血中アミノ酸濃度変化が胎児移行に及ぼす影響を明らかにすることは重要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、妊婦および胎児の健康確保に向けた適正な食事中 Trp インデックス確保の必要性を明確にすることである。目的達成のため、(1) 胎盤アミノ酸輸送系としての LAT1 などトランスポーターの発現、機能を明らかにするとともに、(2) 食事中 Trp インデックスの変化が組織への Trp 移行に与える影響を明らかにするための解析を行った。さらに、胎盤細胞における機能評価を行うためのモデル系として、(3) マウス栄養膜幹細胞を分化させた 3 次元培養系を確立し、トランスポーターなど遺伝子発現変動を網羅的に評価した。

3. 研究の方法

上記(1)-(3)の目的を達成するために、それぞれ以下の方法で解析を行った。

(1) 胎盤関門に発現する輸送体の実体解明を行うため、胎盤細胞膜におけるトランスポータータンパク発現量を LC-MS/MS を用いた質量分析によって、胎盤における mRNA 発現量はリアルタイム PCR 法で、胎盤組織におけるタンパクの発現局在は免疫染色法により解析した。トランスポーターを介した輸送は、トランスポーターを一過性に発現させた細胞を用いて解析した。

(2) Trp インデックスが胎児移行に与える影響を明らかにするため、様々な食品中の Trp インデックスを日本食品標準成分表 2015 年版に基づいて算出した。LAT1 基質の輸送に及ぼすアミノ酸の阻害効果は、ラットあるいは胎盤関門モデル細胞株を用いて評価した。ラットに対して Trp インデックスが異なる食餌を与え、血中アミノ酸濃度に及ぼす影響を HPLC により定量するとともに、体重や組織重量について測定した。

(3) 胎盤細胞における機能評価を行うためのモデル系として、マウス栄養膜幹細胞をマトリゲル包埋型で培養して分化させた 3 次元培養系の評価を行った。Wnt シグナル活性化剤として CHIR99021 を添加し、遺伝子発現量の mRNA レベルでの変動を RNA sequence (RNA-seq) で解析した。

4. 研究成果

(1) 胎盤関門においてトリプトファン(Trp)輸送を担う可能性が高いトランスポーター、LAT1 および LAT2 について、胎盤細胞膜におけるタンパク発現分子数を定量した。その結果、ヒトでは LAT1 および LAT2 の発現分子数が共に高かったのに対し、ラットにおいては LAT1 の発現量が LAT2 に比べて数倍高いことが示された。げっ歯類胎盤における免疫染色においても、LAT1 は胎盤関門の母体側細胞膜において高く発現していたのに対し、LAT2 の発現は明確に示されなかった。LAT1 に比べて、LAT2 のアミノ酸の基質認識性はより広いことから、ヒトにおいてはより多くのアミノ酸の胎児移行に LAT が関与していると考えられる。

胎児中のセロトニン濃度は、Trp からの生合成に影響を受けるが、セロトニン自身の胎盤関門を介した輸送も重要である。胎盤関門に発現するセロトニン輸送体として OCTN に着目し、OCTN1/2/3 をそれぞれ過剰発現させた細胞を用いて、これら輸送体を介した serotonin 取り込み活性の有無を検討した結果、OCTN1 発現細胞においてのみ有意な serotonin 取り込みが示され

た。マウスにおいて胎盤関門を形成する胎盤迷路部における OCTN1 mRNA の発現量は、妊娠進行に伴って上昇していた。さらに、ヒト胎盤刷子縁膜画分およびマウス胎盤迷路部の細胞膜画分におけるタンパク絶対発現量を解析した結果、ヒト胎盤刷子縁膜もしくは妊娠 18.5 日目マウス胎盤迷路部に OCTN1 が発現していることが見出された。妊娠 15.5 日目のマウス胎盤迷路部では OCTN1 の発現が検出されず、これは mRNA レベルでの結果と一致し、OCTN1 が妊娠後期において特に重要な役割を果たすことが裏付けられた。

(2) 食品に含まれる LAT の基質アミノ酸 (イソロイシン、ロイシン、バリン、メチオニン、ヒスチジン、フェニルアラニン、チロシン、および Trp) の総量に対する Trp 存在比率 (%) を「Trp インデックス」と定義し、食品中の Trp インデックスを算出した。その結果、とうもろこしは 0.9% であるのに対し、さといもは 5.0% と、Trp インデックスには最大で 5 倍もの差があることが示された。タンパク質を多く含む食品の中でも、2.3% の魚類や 2.5% の肉類 (いずれも平均値) と比較して、大豆は 3.0% と高いなど、Trp インデックスには食品ごとに一定の差異があることが認められた。したがって、Trp インデックスが胎児への Trp 移行に及ぼす影響を明らかにすることは、栄養科学上重要と考えられる。

ラット胎盤関門モデル TR-TBT 18d-1 細胞における Trp の取り込みは、必須中性アミノ酸濃度の上昇に伴い減少することを明らかにした。さらに、胎盤関門に発現する LAT のうち、LAT1 のみが輸送する基質としてプレガバリンを新たに見出した。LAT1 によってアミノ酸移行が制御されていると考えられる中枢および脊髄において、これら臓器へのプレガバリン移行は血中必須中性アミノ酸濃度の上昇により低下することを明らかにした。以上の結果は、Trp インデックスが組織への Trp 移行に重要な意味を持つことを強く示唆する結果であり、胎盤 LAT1 を介した Trp の胎児移行は血中 Trp インデックス変化の影響を受ける可能性が高い。

ラット飼育繁殖用飼料である日本クレア CLEA Rodent Diet CE-2 の Trp インデックスを計算したところ、2.4% であった。胎児や胎盤への Trp 供給量に影響を与えるのが、食餌中の Trp の絶対量ではなくバランスであることを示すためには、飼料中の Trp の量は同じであるが、Trp インデックスが異なる 2 種の飼料を作成する必要がある。そこで、CE-2 に Trp のみを添加して Trp インデックスを 5.0% に増加させた飼料 A と、CE-2 に Trp だけでなく、他の LAT1 基質アミノ酸も添加して、飼料 A とは Trp の含有量は変わらないが、Trp インデックスが 2.4% のままとされている飼料 B を設計した。本飼料を妊娠ラットの食餌として 12 日間与え、その影響を解析した結果、母体および胎児血漿中トリプトファン濃度は飼料 A 摂食群と飼料 B 摂食群においてほぼ同程度であった (図 1)。また、母獣体重、胎仔体重、胎仔脳重量、胎盤重量にも有意な差は示されなかった。LAT1 を介した輸送は Trp インデックスの低下により減少することが示されていることを併せて考えると、Trp の消化管吸収における LAT の関与が低いことが、血中濃度に変化が示されなかった主要因として考えられる。消化管に発現する中性アミノ酸トランスポーターは複数存在することが知られており、複数のトランスポーターが関与することで、全体として食事が吸収量に与える影響を最小限にしているとも考えられる。

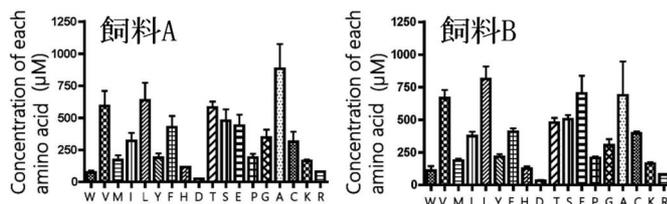


図1 胎児血中アミノ酸濃度

(3) 胎盤栄養膜幹細胞をマトリゲルに包埋して 3 次元培養することで、胎盤を構成する各栄養膜細胞へとより高度に分化させることが可能になること、そして、Wnt シグナルを活性化することで、胎盤関門の実体である合体栄養膜細胞への分化をより促進できることを明らかにした。3 次元培養した栄養膜幹細胞において RNA-Seq 解析を行った結果、Wnt シグナルを活性化させることで、胎盤関門に発現する MDR1 などの発現上昇が示されたが、LAT1 や OCTN1 の発現量増加は観察されなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

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 -
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 Inagaki Mai, Nishimura Tomohiro, Nakanishi Takeo, Shimada Hiroaki, Noguchi Saki, Akanuma Shin-ichi, Tachikawa Masanori, Hosoya Ken-ichi, Tamai Ikumi, Nakashima Emi, Tomi Masatoshi	4. 巻 23
2. 論文標題 Contribution of Prostaglandin Transporter OATP2A1/SLC02A1 to Placenta-to-Maternal Hormone Signaling and Labor Induction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101098
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101098	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nishimura Tomohiro, Sano Yuichiro, Takahashi Yu, Noguchi Saki, Uchida Yasuo, Takagi Akinori, Tanaka Takahiro, Katakura Satomi, Nakashima Emi, Tachikawa Masanori, Maruyama Tetsuo, Terasaki Tetsuya, Tomi Masatoshi	4. 巻 108
2. 論文標題 Quantification of ENT1 and ENT2 proteins at the placental barrier and contribution of these transporters to ribavirin uptake.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical Sciences	6. 最初と最後の頁 3917-3922
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xphs.2019.09.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Yu, Nishimura Tomohiro, Higuchi Kei, Noguchi Saki, Tega Yuma, Kurosawa Toshiki, Deguchi Yoshiharu, Tomi Masatoshi	4. 巻 35
2. 論文標題 Transport of Pregabalin Via L-Type Amino Acid Transporter 1 (SLC7A5) in Human Brain Capillary Endothelial Cell Line	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pharmaceutical Research	6. 最初と最後の頁 246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11095-018-2532-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 野口 幸希, 高橋 優, 西村 友宏, 登美 斉俊
2. 発表標題 プレガバリンのラット脳移行における血漿中LAT1基質アミノ酸の影響
3. 学会等名 第15回トランスポーター研究会年会
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
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 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 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木林由佳、野口幸希、田辺美那子、齋藤義正、西村友宏、登美斉俊
2. 発表標題 マウス栄養膜幹細胞3次元培養系における閉門機能分子の発現誘導
3. 学会等名 日本薬剤学会第34年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野村岳広、野口幸希、西村友宏、登美斉俊
2. 発表標題 血漿タンパク結合率が薬物胎児移行性の種差に及ぼす影響
3. 学会等名 日本薬剤学会第34年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 潘曉染、野口幸希、安藤美鈴、竹村千尋、西村友宏、登美斉俊
2. 発表標題 miR-126が栄養膜モデルJEG-3細胞における合胞体化促進因子の発現に与える影響
3. 学会等名 日本薬剤学会第34年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木林由佳、野口幸希、田辺美那子、齋藤義正、西村友宏、登美斉俊
2. 発表標題 マウス栄養膜幹細胞3次元培養系における閉門機能分子の発現誘導
3. 学会等名 日本薬物動態学会第34回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomi Masatoshi、Noguchi Saki、Nishimura Tomohiro
2. 発表標題 Possibilities and limitations of extrapolating fetal drug transfer data from rodents to human pregnancy
3. 学会等名 Asian Federation for Pharmaceutical Sciences (AFPS) 2019 Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋優、西村友宏、樋口慧、野口幸希、手賀悠真、黒澤俊樹、 出口芳春、登美斉俊
2. 発表標題 LAT1 が血液脳関門におけるpregabalin 輸送に果たす役割
3. 学会等名 日本薬学会第33年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 "高橋優、西村友宏、樋口慧、野口幸希、手賀悠真、黒澤俊樹、 出口芳春、登美斉俊"
2. 発表標題 血液脳関門における中性アミノ酸トランスポーターLAT1 を介したpregabalin輸送
3. 学会等名 第40回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tanabe M, Noguchi S, Nishimura T, Tomi M
2. 発表標題 Induction mechanism of MDR1 in mouse trophoblast stem cell differentiation
3. 学会等名 International Federation of Placenta Associations (IFPA) 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomi M
2. 発表標題 The physiological and pharmacological roles of organic anion transporter 4 in the placenta
3. 学会等名 International Federation of Placenta Associations (IFPA) 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 飛田萌子、野口幸希、木村りか、福本文香、西村友宏、登美斉俊
2. 発表標題 OAT4を介したlosartan carboxylic acidおよびcandesartanのCl ⁻ -依存性輸送
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井坂真実、西村友宏、稲垣舞、田辺美那子、野口幸希、登美斉俊
2. 発表標題 マウス栄養膜幹細胞の分化に伴うOATP2A1発現変動とHIF1 α の影響
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野村岳広、西村友宏、野口幸希、登美斉俊
2. 発表標題 胎児/母体血漿中非結合形濃度比を用いたdigoxinのラット胎盤透過性評価
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 潘曉楽、野口幸希、安藤美鈴、竹村千尋、西村友宏、登美育俊
2. 発表標題 ヒト栄養膜由来JEG-3細胞の分化過程におけるmiR-126の役割
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019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	野口 幸希 (Noguchi Saki) (10803661)	慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・助教 (32612)	
研究分担者	伊藤 直樹 (Ito Naoki) (20529177)	帝京大学・医学部・講師 (32643)	
研究分担者	牟田 真理子 (Muta Mariko) (40445193)	帝京平成大学・健康メディカル学部・教授 (32511)	

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
---------	---------