

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：34414

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460242

研究課題名(和文)人工多能性幹細胞(iPS細胞)を用いた胎盤薬物透過性評価系の構築に関する研究

研究課題名(英文) Approach for Differentiating Trophoblast Cell Lineage from Human Induced Pluripotent Stem Cells with Retinoic Acid

研究代表者

池田 賢二(Ikeda, Kenji)

大阪大谷大学・薬学部・准教授

研究者番号：10434812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでにヒト絨毛がん細胞株(JEG3)を用いてin vitro医薬品胎児移行性評価系を構築してきたが、さらに妥当性を検証する必要があった。今回、生体内をよりよく反映するモデル構築のために、人工多能性幹(iPS)細胞が胎盤様細胞へと分化すること、および収率を検討した。高濃度Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP4)刺激によって胎盤指標であるhCG分泌能は著しく上昇することが確認できたが収率に問題があった。BMP4未処理のRetinoic acid (RA)刺激群のhCG分泌能も顕著に増加しており、RA刺激によって効率よく胎盤様細胞を得られる可能性が示唆された。

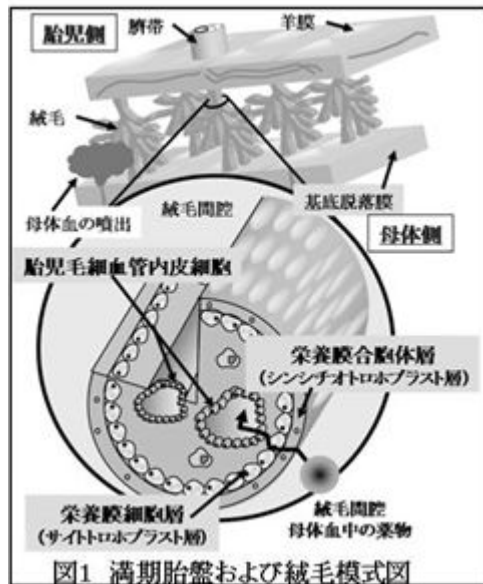
研究成果の概要(英文)：Evaluation of placental drug transport is the first step in chemotherapeutic safety evaluations during pregnancy, but a well-established in vitro model is not available. Therefore, it is necessary to increase the similarities between the syncytiotrophoblast, the main layer of the placental barrier, and the in vitro evaluation model. We focused on the in vivo similarities of differentiating induced pluripotent stem cells (iPSCs). In this study, the conditions required to differentiate iPSCs into syncytiotrophoblasts, such as retinoic acid (RA), a factor required for the differentiation of hematopoietic stem cells from iPSCs, were investigated using hCG secretion as a marker of syncytiotrophoblasts. We demonstrated that iPSCs differentiate into syncytiotrophoblasts, characterized by marked hCG secretion after RA treatment. Our future studies will involve optimization of the differentiation conditions for iPSC-derived syncytiotrophoblast cell layers by RA.

研究分野：臨床薬剤学

キーワード：妊娠時薬物療法 胎児移行性 iPS 分化 シンシチオトロホプラスト 胎盤 レチノイン酸

1. 研究開始当初の背景

妊娠時の薬物療法においては倫理的背景によって治験段階で妊婦が除外されており、胎盤薬物透過性および胎児毒性の情報が乏しい現状がある。そのために、妊娠時薬物治療では同種の医薬品における胎児安全性の基準となり得る指標の確立が待望されている。胎盤には、図1に示すとおり、母体血と胎児血間で物質交換を行う絨毛組織がある。



母体血中の物質は、絨毛のトロホプラスト層を透過した後、絨毛内の胎児毛細血管内皮細胞層を通過して、胎児血中へと拡散または運搬される。胎盤絨毛組織において物質透過の制御に関わる細胞は、主にシンシチオトロホプラスト細胞層であると考えられている。胎盤透過性に関連する研究動向としては、トロホプラスト細胞を用いた薬物の単層膜透過研究、細胞膜を使用した薬物の細胞内取り込み研究、薬物透過へのトランスポーターの関与研究などの報告があるが、既報のトロホプラスト単層膜による胎盤薬物透過性評価では、大きな細胞間隙透過の影響のために未だ胎児移行性を示す指標としての意義が明確ではない。胎盤薬物透過評価モデルには、胎盤の性質をよく反映し、かつこれまで不十分であったトランスポーターなどを介した経細胞輸送の影響をも表現し得るモデルが必要である。

2. 研究の目的

このような背景を踏まえて、我々は、これまでにトロホプラスト様ヒト絨毛癌細胞株 JEG-3 を用いて分化条件を検討し、妥当なバリア能およびシンシチオトロホプラスト層の分化指標を表現し得るモデル(DJEG モデル)を確立してきた。正常絨毛組織におけるサイトトロホプラストは組織の外壁を構成しつつ分化を行い、母体血-胎児血バリア層を構成するシンシチオトロホ

プラストとなる。ここで、経上皮電気抵抗値 (TEER) はイオン透過性を表し、細胞間隙を通過する物質透過の良い指標となり、シンシチオトロホプラスト様の細胞間隙透過抑制度を検討できる指標である。またサイトトロホプラストは、分化により排出トランスポーターである P-glycoprotein (Pgp/ABCB1) の発現が抑えられ、Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) が誘導されることが報告されている。さらには、JEG-3 などの絨毛癌細胞株は、分化サイトトロホプラストとは異なり、not-expressed choriocarcinoma 1 (NECC1) の発現が抑えられているとの報告もある (図2)。また TEER 上昇の誘因には、Tight junction 形成および Fusion 能の獲得 (図3) が考えられる。

ここで我々は、至適分化させた JEG-3 層 (DJEGs) を作製して TEER 上昇を伴った妥当なバリア能およびシンシチオトロホプラスト層の分化指標を表現し得る胎盤薬物透過性評価モデルの検討を行ってきた。さらに DJEGs モデルを用いて、BCRP の基質であるシメチジンの両方向の透過性を比較検討した結果、母体側に局在する BCRP のシメチジン排出機能を反映できており (図4)、トランスポーターの機能面でもシンシチオトロホプラスト様を示すことを明かとした。妊娠時薬物治療の指標として、ひとつには

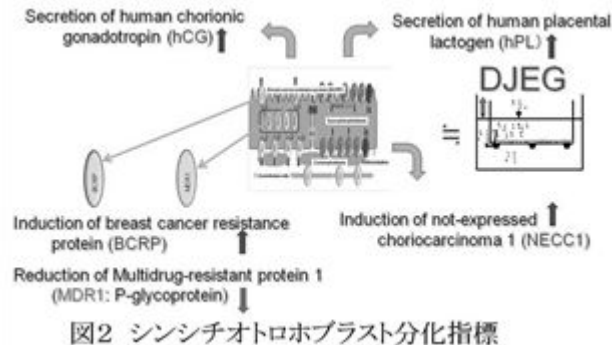
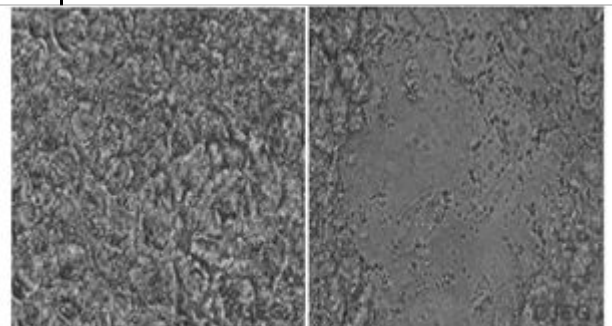


図2 シンシチオトロホプラスト分化指標

ヒトにおいて胎児血 / 母体血中濃度比 (F/M 比) がいくつか示されている。したがって、指標としての意義を高めるためには、これらヒトにおいて示されている F/M 比と DJEGs モデルの F/M 比 (F/MDJEG) が相関している必要がある。しかしながら、シメチジンに



Phase-contrast microscopy (× 200) of JEG-3 cells on plastic plates.

図3 DJEGsの細胞融合能獲得

において F/MDJEG が明らかに母体への能動的な排出を示した濃度は、治療濃度域よりも

低濃度の場合のみであった(図5)。

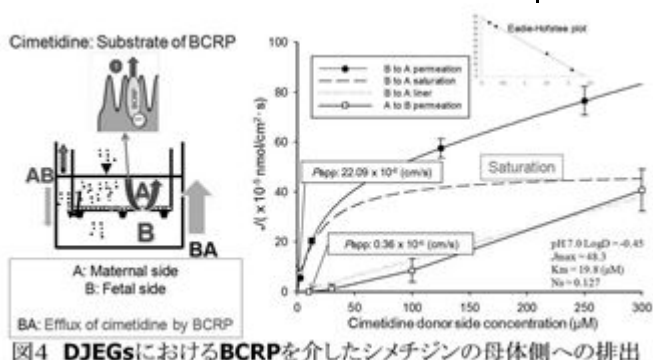


図4 DJEGsにおけるBCRPを介したシメチジンの母体側への排出

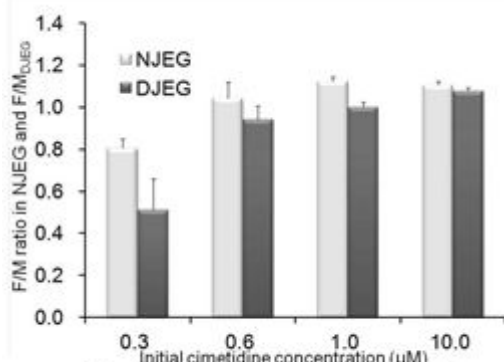


図5 シメチジンにおけるNJEGのF/M ratioとF/M DJEGの相違

本結果から、より正確な胎盤薬物透過性評価系を構築するために、さらなるシンシチオトロホプラスト化が必要であると考えられる。そこで今回、さらに生体内に類似した細胞層を構築するために、人工多能性幹細胞(iPS細胞)の生体内類似性に着目し、iPS細胞を用いた胎盤薬物透過性評価モデルの構築に関する検討を行った。

現在、胚性幹細胞(ES細胞)およびiPS細胞によって、トロホプラスト細胞への分化条件が検討されているものの、ES細胞を研究上利用するためには、一般的に未だ倫理的問題が存在する。また、これらの検討で用いられているトロホプラスト細胞としての指標は、胎盤特異的ホルモンの分泌能など胎盤細胞の機能的特徴であり、物質透過を制御するシンシチオトロホプラスト層との類似性は未知である。したがって、検討されているトロホプラスト細胞への分化条件、およびシンシチオトロホプラスト分化指標に関する我々の検討結果を参考に、比較的倫理的問題が解決されているiPS細胞を用いた胎盤薬物透過性評価モデルの構築を検討することが妥当である。そのためには、DJEGsモデルの構築段階で得られたシンシチオトロホプラストへの分化指標を加えて検討し、iPS細胞からシンシチオトロホプラストへの分化条件を探索する必要がある。本課題の骨子は、iPS細胞の分化条件を探索し、上述のシンシチオトロホプラスト分化指標を用いて、iPS細胞からシンシチオトロホプラスト層を構築することにある。

### 3. 研究の方法

#### 1) 細胞培養

iPS細胞, 409B2 (HPS0076, RIKEN BioResource Center) は、Matrigel (Thermo Fisher社) でコーティングした培養皿を用いて、basic fibroblast growth factor (bFGF, REPROCELL) of 5 ng/mL を添加した FF2<sup>®</sup> (REPROCELL) 培地で維持培養した。

#### 2) 分化培養

維持培養した iPS 細胞が十分に増殖した後、トロホプラスト系列細胞への分化試薬、bone morphogenetic protein 4 (BMP4)、retinoic acid (RA) を添加し、2 週間程度分化培養を行った。BMP4 と RA での分化培養において、胎盤細胞の指標となる human chorionic gonadotropin (hCG) 分泌能を比較した。また、今後の胎児移行性モデルとしての透過検討を行うため、細胞層は培養皿全面を覆う一層化が必要であり、適正な条件探索のため、シンシチオトロホプラスト分化した iPS 細胞を再分散させ、細胞外マトリクス extracellular matrix (ECM)、collagen type I、type IV、poly-D lysine、fibronectin、laminin、Matrigel でコーティングした培養皿に再播種した後、さらに 8 日間までの hCG 分泌を測定した。

#### 3) hCG 分泌の測定

hCG 分泌能の測定は、hCG enzyme immunoassay test kit (E29-117, Funakoshi) を用いて、各培養細胞培養上清中の hCG 量を定量した。また、hCG 簡易測定として、hCG measurement sticks (Gold sign HCG-HK<sup>®</sup>, Morinaga Milk社) を用いた。

### 4. 研究成果

#### 1) トロホプラスト系列細胞へと分化した iPS 細胞層からの hCG 分泌能

これまでに、高濃度 BMP4 処理によって iPS 細胞がトロホプラスト系列細胞へと分化することは知られている。しかしながら、BMP4 は、iPS 細胞を他にも多様な細胞群へと分化させることが出来る。薬物動態モデルを作製するためには、効率よくモデルとする器官の特性を有した単一の細胞群へと分化させる必要が有る。RA 処理は、iPS 細胞を主に血球細胞へと分化させる。血球細胞は、浮遊培養が可能である場合が多く、接着細胞であるシンシチオトロホプラストとは分離できる可能性が高い。今回、高濃度 BMP4 処理によって hCG 分泌は、5 日目に開始され、11 日目までピークに達したが、BMP4 処理を中止した 7 日目以降は BMP4 誘導分化 iPS 細胞からの hCG 分泌は消失した(図 6A)。また、RA 誘導分化 iPS 細胞からの hCG 分泌は、BMP4 誘導の場合と同レベルであった(図 6B)。さらに、RA 誘

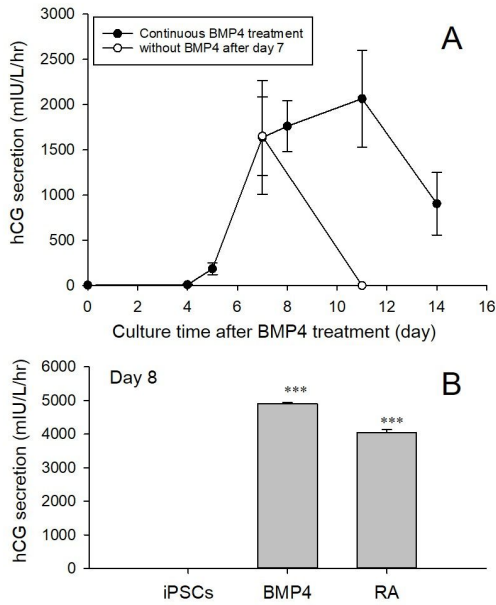


図6 BMP4とRAIによって分化させたiPS細胞からのhCG分泌

導分化 iPS 細胞からの hCG 分泌は、BMP4 処理とは対照的に、RA 処理を中止した後も少なくとも 7 日間維持された (図 7)。また、RA に

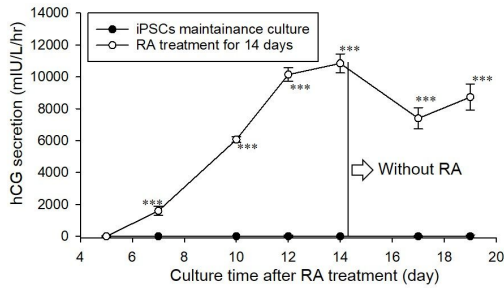


図7 RAIによって分化させたiPS細胞からのhCG分泌経時変化

よって iPS 細胞をトロホプラスト分化させる時、RA 濃度は 500 nM 以上で飽和した。このことから、分化処理に用いる RA 濃度は、500 nM が最適であると言える (図 8)。

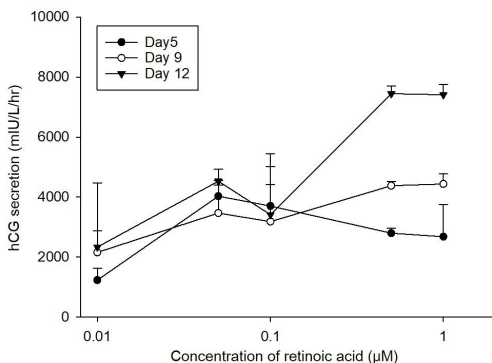


図8 分化iPS細胞からのhCG分泌のRA濃度依存性

これらの結果より、BMP4 を用いずに RA 処理のみによって iPS 細胞をシンシチオトロホプ

ラストへと分化させることが可能であることが示唆され、本 RA 分化条件が胎児移行性モデル作製の構築に有用であることが明らかとなった。

## 2) RA による iPS 細胞のトロホプラスト系細胞への分化に及ぼす再播種と細胞外マトリクスの影響

RA 分化 iPS 細胞層は、形態的にもシンシチオトロホプラスト様の細胞融合形態を示した (図 9)。しかしながら、iPS 細胞はコロニー

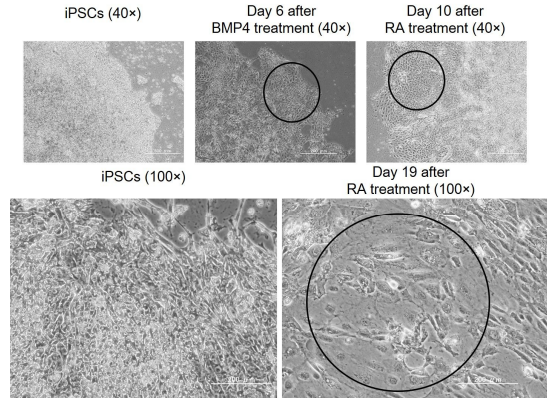


図9 分化iPS細胞の位相差顕微鏡像

として、培養皿内で不均一に増殖する。分化細胞も、一部コロニーから逸脱して平面的に広範囲に増殖するが、全面を単一細胞層とすることは困難である。そこで、分化後再分散させ、さらに数種の細胞外マトリクス上に再播種することで、hCG 分泌の維持能を測定した。その結果、Collagen type IV によるコーティング培養皿上で分化させた RA 分化 iPS 細胞は、全面に均一な細胞層を形成し、さらに RA 処理を中止した再分散、再播種後も少なくとも 8 日間 hCG 分泌能を維持することが示された (図 10)。

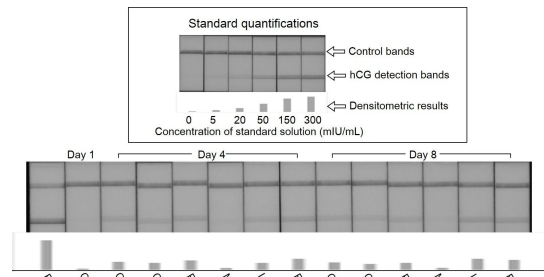


図10 RA分化iPS細胞の再分散再播種後のhCG分泌簡易測定

これらの結果から、iPS 細胞を RA の 500 nM によって分化させ、これを再分散し、Collagen type IV コーティング上に再播種することで、*in vitro* 胎児移行性モデルに最適な細胞層を得ることができると示唆された。今後は、分化 iPS 細胞のトロホプラスト関連遺伝子、細胞内タンパク発現、トランスポーター発現などの指標検証により、効果的な *in vitro* 胎児移行性モデルが確立するものとする。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

池田 賢二、植田 ちづる、山田 千紗、中村 歩加、初田 泰敏、川西 園代、西井 諭司、小川 雅史、Carrier-Mediated Placental Transport of Cimetidine and Valproic Acid across Differentiating JEG-3 Cell Layers、*Pharmazie*、査読有、70 巻 (7)、2015、471-476、doi : 10.1691/ph.2015.4193

[学会発表](計7件)

川崎 由菜、池田 賢二、松田 仁美、岸田 紗穂、糸数 優希、木曾 愛美、浦嶋 庸子、廣谷 芳彦、*In Vitro Treatment of Induced Pluripotent Stem Cells with Retinoic Acid for the Placental Drug Transport Evaluation Model*、15th International Congress of Therapeutic Drug Monitoring & Clinical Toxicology、2017

池田 賢二、前田 葉子、*In vitro approach for placental drug transport studies using induced pluripotent stem cells*、15th International Congress of Therapeutic Drug Monitoring & Clinical Toxicology、2017

池田 賢二、iPS 細胞を用いた *in vitro* 医薬品胎児移行性評価系の構築に関する検討、第 38 回白金シンポジウム、2017

池田 賢二、川崎 由菜、松田 仁美、浦嶋 庸子、廣谷 芳彦、iPS 細胞を用いた *in vitro* 医薬品胎児移行性評価系の確立に関する検討～その 2 遺伝子解析から～、第 26 回日本医療薬学会、2016

川崎 由菜、池田 賢二、松田 仁美、浦嶋 庸子、廣谷 芳彦、iPS 細胞を用いた *in vitro* 医薬品胎児移行性評価系の確立に関する検討～その 1 機能解析から～、第 26 回日本医療薬学会、2016

池田 賢二、漢方は周産期医療を照らせるか、平成 28 年度薬剤師漢方セミナー、2016

池田 賢二、*In vitro Approach for the Placental Drug Transport Evaluation Model Using Induced Pluripotent Stem Cells*、14th International Congress of Therapeutic Drug Monitoring & Clinical Toxicology (IATDMCT)、2015

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

池田 賢二 (IKEDA, Kenji)  
大阪大谷大学・薬学部・准教授  
研究者番号：10434812

(2)研究分担者

( )  
研究者番号：

(3)連携研究者

浦嶋 庸子 (URASHIMA, Yoko)  
大阪大谷大学・薬学部・助教  
研究者番号：90636309

(4)研究協力者

小川 雅史 (OGAWA, Masafumi)  
大阪大谷大学・薬学部・非常勤講師