

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14972

研究課題名（和文）母体-胎児間の物質輸送に着目した、抗てんかん薬の児への脳機能リスク評価と回避策

研究課題名（英文）Antiepileptic drug risk assessment and harm reduction strategy for fetal brain function: Focus on cross-placental substance exchange

研究代表者

古堅 彩子（Furugen, Ayako）

北海道大学・薬学研究院・助教

研究者番号：90767261

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、抗てんかん薬が胎盤トランスポーター発現に及ぼす影響ならびに輸送機構に関して検討した。胎児へのリスクがあるバルプロ酸（VPA）が18種類のトランスポーターに及ぼす影響をin vivoにおいて評価した。VPAはラット胎盤における各種トランスポーター発現量を変化させること、その変動は妊娠期において傾向が異なることが示された。また、妊娠可能年齢女性に選択されるラモトリギン（LTG）の胎内曝露に寄与する因子について検討した。LTGの胎盤細胞への取り込みは、chloroquine, imipramine, quinidine, verapamilに阻害される輸送担体が寄与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

VPAは、認知機能低下や自閉症といった出生児の脳機能に影響する可能性が示されている抗てんかん薬である。本研究において、VPAはラット胎盤における各種トランスポーター発現量を変化させることを示した。また、妊娠可能年齢女性に選択されるLTGの胎盤由来細胞における輸送特性を明らかにした。本成果を基に、変動したトランスポーター、輸送に寄与することが示されたトランスポーターについて、その基質や阻害剤の投与が及ぼす効果を評価することで、リスクを低減させる物質の探索に繋げる。本研究の進展は、抗てんかん薬のリスク評価及び回避策の構築に貢献できるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study investigated the effects of antiepileptic drugs on placental transporter expression and the mechanism of antiepileptic drug transport across the placenta. We investigated the in vivo effects of valproic acid (VPA), which presents several risks to the fetus, on the gene expression of 18 transporters in the placenta. Pregnant rats were orally administered 400 mg/kg/day of VPA for 4 days during mid- or late gestation. VPA administration altered the expression of several transporters in the rat placenta, which suggested differing sensitivity to VPA across gestational stages. We also investigated the factors involved in fetal exposure to lamotrigine (LTG), which is frequently prescribed for treating women with epilepsy. Our results using human placental cell lines indicated that a carrier inhibited by chloroquine, imipramine, quinidine, and verapamil was involved in the transport of LTG.

研究分野：医療系薬学

キーワード：抗てんかん薬 胎盤 トランスポーター バルプロ酸 ラモトリギン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

妊娠時のてんかん治療では、発作が母児へ及ぼす影響と、抗てんかん薬による胎児リスクの両方を考慮する。近年、抗てんかん薬であるバルプロ酸 (Valproic acid: VPA) は、認知機能低下や自閉症といった出生児の脳機能に影響する可能性が示されている^[1]。しかしながら、その発症メカニズムは十分に解明されていない。また、臨床において様々な抗てんかん薬が使用されるものの、妊娠時における情報が十分でない薬剤も存在する。一方、母体と胎児間の物質輸送を担う胎盤のトランスポータは、胎内環境を制御するために重要である。本研究では、抗てんかん薬の「胎盤トランスポータ発現変動を介した影響」と「胎内への直接的曝露の影響」に着目した。

2. 研究の目的

本研究は、抗てんかん薬のリスク評価および低減を最終目標とし、抗てんかん薬が胎盤トランスポータ発現に及ぼす影響ならびに輸送機構を明らかにすることを目的とした。本研究では、胎児へのリスクが明らかである VPA が胎盤トランスポータ発現に及ぼす影響を *in vivo* において評価した。また、妊娠可能年齢女性に選択されるラモトリギン (LTG) の胎内曝露に寄与する因子について *in vitro* において検討した。

3. 研究の方法

(1) 使用動物

妊娠 Wistar 雌性ラット (12-13 週齢) を購入し使用した。プラグ確認日を妊娠 0 日目 (Gestational day 0: G0) とし、G9-13 を妊娠中期、G16-20 を妊娠後期とした。動物実験プロトコルは北海道大学 動物実験委員会により承認を得た。VPA Na を蒸留水に溶解し、ろ過滅菌した溶液を使用した。ゾンデ管を用いて、VPA Na 溶液を 1 日 1 回 (400 mg/kg/day) 4 日間連続で経口投与した。妊娠中期の検討では G9-12、後期では G16-19 に投与した。Control 群には同量の水を投与した。最終投与 24 時間後にセボフルランによる麻酔下で断頭し、開腹して胎盤を回収した。摘出した胎盤は氷冷した PBS で洗浄した。

(2) 使用細胞

ヒト胎盤モデルとして、ヒト胎盤絨毛癌由来 BeWo 細胞および JEG-3 細胞を使用した。ラモトリギン (LTG) の取り込み実験を行い、LC/MS/MS により定量を行った。

(3) ヒト胎盤組織

ヒト胎盤組織を用いた検討は、北海道大学病院 自主臨床研究審査委員会の承認を得て実施した。帝王切開による出産後、1 時間以内に搬出し実験に使用した。胎盤を生理食塩水で洗浄後、絨毛部分を回収した。

(4) Real-time PCR および RT-PCR

細胞、ラット胎盤、ヒト胎盤から ISOGENII を用いて total RNA を抽出し、Rever Tra Ace を用いて逆転写を行った。Real-time PCR は、KAPA SYBR Fast qPCR Kit を用い、反応および検出には Light Cycler® 480 System II を使用した。また、RT-PCR では、HotStarTaq を使用した。PCR 産物を 2% アガロースゲルにアプライし、電気泳動を行った。泳動したゲルを ethidium bromide で染色しバンドを観察した。

(5) 統計解析

2 群間の有意差の検定は、Student's t-test により行った。ラット胎盤の遺伝子発現は妊娠期と VPA 投与を要因として、two-way analysis of variance (ANOVA) により解析した。2 要因に交互作用があった場合は Tukey-Kramer test を行った。P < 0.05 を統計的に有意とした。

4. 研究成果

(1) バルプロ酸ナトリウム (VPA Na) 投与がラット胎盤トランスポータ発現に及ぼす影響

はじめに、VPA Na 経口投与により VPA および毒性に関与する活性代謝物 4-ene-VPA が血中に存在することを LC/MS/MS により確認した (表 1)。その結果、投与 30 分後 (最高血中濃度到達時間) の VPA 血漿中濃度が過去の報告^[2]と近い値を示し、24 時間後には消失していることが示された。また、妊娠中期と後期において大きな違いは観察されなかった。さらに、連続投与による血中への VPA および 4-ene-VPA の蓄積はないことが示された。

表1 VPA Na 経口投与後のVPAおよび4-ene-VPA血中濃度

Time after administration		Mid-gestation				Late gestation					
		VPA (µg/mL)		4-ene-VPA (µg/mL)		VPA (µg/mL)		4-ene-VPA (µg/mL)			
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD		
Day 1	30 min	G9	159	38.8	1.62	0.0858	G16	241	4.93	1.41	0.230
Day 2	24 h	G10	a		a		G17	a		a	
	30 min		160	14.5	2.02	0.680		261	157	1.36	0.361
Day 3	24 h	G11	a		a		G18	a		a	
	30 min		286	151	1.61	0.205		200	30.1	1.76	0.301
Day 4	24 h	G12	a		a		G19	a		a	
	30 min		98.8	67.0	2.08	0.544		146	102	1.95	0.151
Day 5	24 h	G13	a		a		G20	a		0.437	0.308

Mean with SD (n=3). a: less than the lower limit of quantification (LLOQ).

また、G20 において、VPA Na の連続投与により母体体重増加量は Control 群の約半分まで減少した (図 1A 右)。一方、G13 では投与群と Control 群に差は観察されなかった (図 1A 左)。また、胎盤重量は G13、G20 とともに VPA 投与群において減少することが明らかとなった (図 1B)。

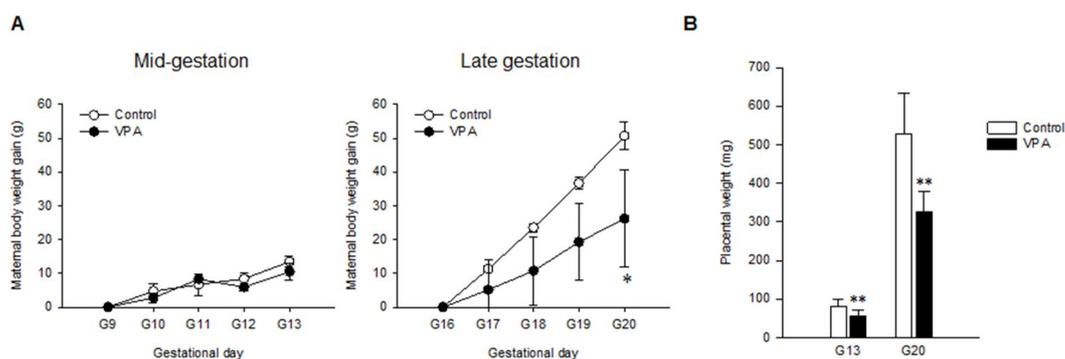


図 1 VPA Na 経口投与後の母体体重増加 (A) および胎盤重量 (B)
(A) Mean with SD (n=3 dam). (B) Mean with SD (n=32-40 placentas from 3 dams). **: $P < 0.01$. *: $P < 0.05$.

続いて、VPA Na が 8 種類の ABC トランスポータ mRNA 発現に及ぼす影響を real-time PCR にて評価した。ラットの妊娠期と VPA 投与を要因とした two-way ANOVA により、rMdr1a, rMrp1, rMrp3, rMrp4, rMrp5, rBcrp において交互作用が統計的に有意であることが示された。多群間の比較により、VPA 投与群では G13 において rMrp1, rMrp5 が増加し (図 2C, G)、rMrp3 は減少することが示された (図 2E)。G20 においては、rMdr1a が増加し (図 2A)、rMrp4 は減少することが示された (図 2F)。rBcrp では、Control 群と VPA 投与群に有意差は見られなかった (図 2H)。また、妊娠の進行に伴い、rMdr1a, rMrp4 は増加し (図 2A, F)、rMrp3, rMrp5, rBcrp は減少した (図 2E, G, H)。rMdr1b へ及ぼす影響には交互作用がなかったが、妊娠の進行に伴い増加し、VPA 投与により減少傾向を示した (図 2B)。rMrp2 は G13 において発現量が少なく、評価することができなかった (図 2D)。

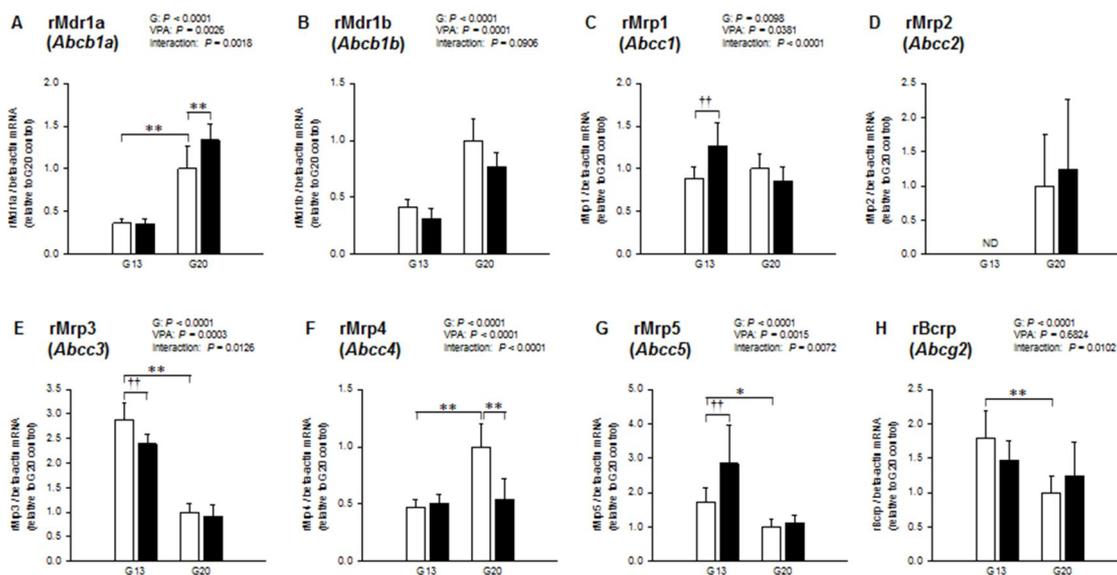


図 2 VPA Na 経口投与が ABC トランスポータ mRNA 発現に及ぼす影響
Mean with SD (n=10-12 placentas from three dams). *: $P < 0.05$ when compared to the G20 control. **: $P < 0.01$ when compared to the G20 control. ††: $P < 0.01$ when compared to the G13 control. ND: not determined because of low expression.

10 種類の SLC トランスポータに関しても同様に mRNA 発現量の評価を行った (図 3)。ラットの妊娠期と VPA 投与を要因とした two-way ANOVA により、rLat1, rLat2, rOctn1, rOctn2, rEnt1, rOatp2a1, rOatp4a1 において妊娠期と VPA 連続投与の交互作用は統計的に有意であることが示された。多群間の比較により、G13 において rLat2, rOctn2, rEnt1, rOatp2a1 が VPA により増加することが示された (図 3B, F, G, H)。一方、G20 においては rLat1, rOctn1, rOatp4a1 が減少することが示された (図 3A, E, J)。また、妊娠の進行に伴い、rLat1, rOctn1, rOatp4a1 は 5 倍以上増加し (図 3A, E, J)、rEnt1 は減少した (図 3G)。交互作用がなかったトランスポータについては、rMct4, rOct3, rOatp2b1 が妊娠に伴い増加傾向を示した (図 3C, D, I)。

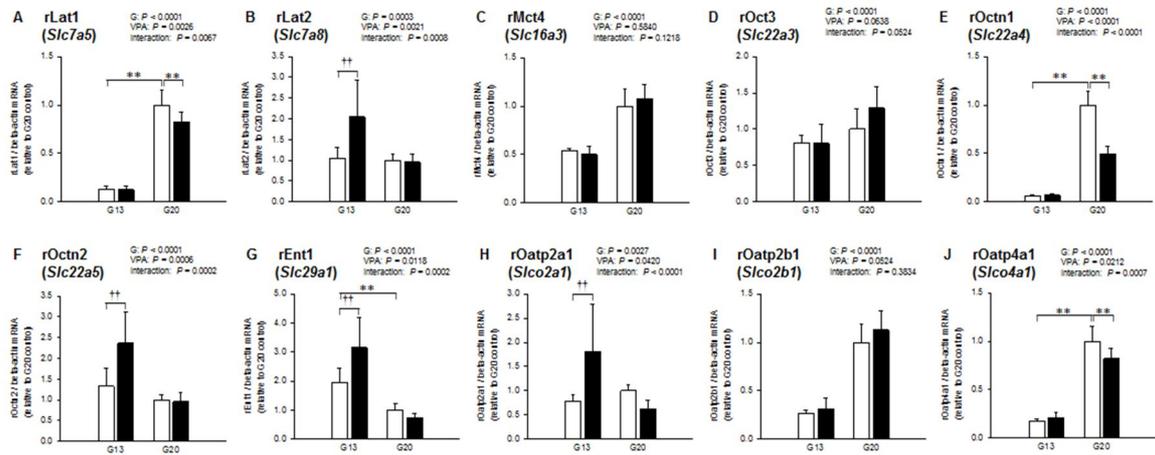


図 3 VPA Na 経口投与が ABC トランスポータ mRNA 発現に及ぼす影響

Mean with SD (n=10-12 placentas from three dams). **: $P < 0.01$ when compared to the G20 control. ††: $P < 0.01$ when compared to the G13 control.

これまでの結果より、VPA Na 経口投与は生体異物、抱合体、プロスタグランジン、cyclic nucleotides、アミノ酸、カルニチン、ピリミジン塩基等の輸送を担う胎盤トランスポータ mRNA 発現を変動させることが示された。変化したトランスポータの中には、脳機能と関連のある物質を基質とするものが含まれることから、これらの変化は胎児への毒性と関連する可能性が考えられる。また、その変動は同じトランスポータあっても G13 と G20 において傾向が異なる場合があったことから、VPA が胎盤へ及ぼす影響は妊娠時期により異なる可能性が示唆された。

(2) LTG の胎盤における輸送機構に関する評価

これまでに、血液脳関門における LTG 取り込みには organic cation transporter 1 (OCT1, *SLC22A1*) が関与することが示唆されている^[3]。また、LTG の構造からカチオン系の輸送担体である OCTs (*SLC22A1-3*) および organic cation/carnitine transporters (OCTNs, *SLC22A4, 5*) に着目し、胎盤絨毛癌由来細胞 (BeWo, JEG-3) およびヒト胎盤絨毛における mRNA 発現を RT-PCR 法にて確認した。その結果、BeWo 細胞および JEG-3 細胞において、OCT1 および OCTN1, 2 の発現が確認された (図 4A, B)。また、ヒト満期胎盤絨毛においては、全ての発現が確認されたものの OCT1, 2 のバンド強度は弱いものであった (図 4C 左)。

また、日本人ボランティア 5 人から供与された胎盤を用いて、発現レベルを real-time PCR にて比較した。その結果、発現レベルは、OCTN2 > OCT3 > OCTN1 > OCT1 ≈ OCT2 の順であることが示唆された (図 4C 右)。

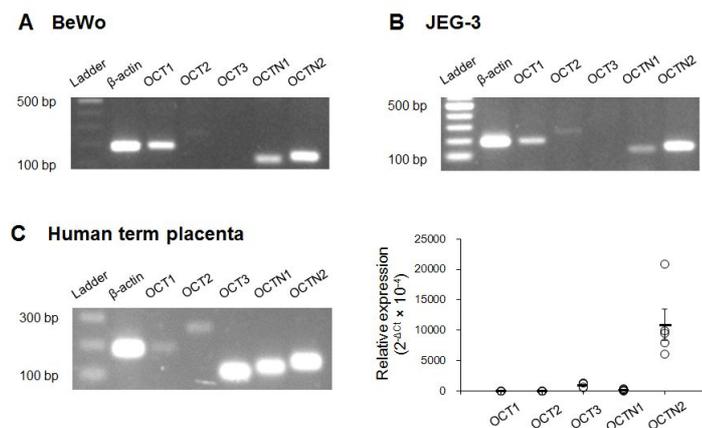


図 4 BeWo (A), JEG-3 (B), ヒト満期胎盤 (C) における mRNA 発現確認

続いて、BeWo 細胞および JEG-3 細胞における LTG の取り込み特性を評価した。LTG の細胞への取り込みは、約 30 秒まで直線性が確認されたことから (図 5A, B)、以降の取り込み時間を 15 秒と設定した。また、37°C および氷冷した条件を 4°C として LTG の濃度依存的な取り込みを評価した。37°C における取り込み量は 4°C と比較して高く、高濃度で飽和する傾向を示した (図 5C, D)。したがって、LTG の取り込みには輸送担体が関与している可能性が考えられた。また、4°C における取り込みも観察されたことから、吸着と受動拡散も大きいことが示唆された。37°C における取り込みから 4°C における LTG の取り込みを差し引いた値を用いて、速度論的パラメーターを算出した。その結果、BeWo 細胞は $K_m = 904.5 \pm 438.7 \mu\text{M}$ 、 $V_{\text{max}} = 26.6 \pm 6.2 \text{ nmol}/15 \text{ sec}/\text{mg protein}$ 、JEG-3 細胞は $K_m = 1289 \pm 366.4 \mu\text{M}$ 、 $V_{\text{max}} = 24.6 \pm 3.8 \text{ nmol}/15 \text{ sec}/\text{mg protein}$ と見積もられた。LTG の臨床的な血中濃度は 10 - 60 μM 付近であり^[4]、当担体が胎盤輸送に寄与するか否かはさらに検証する必要がある。また、細胞外 pH や Na^+ が LTG の取り込みに及ぼす影響は小さいと考えられた (図 5E, F)。

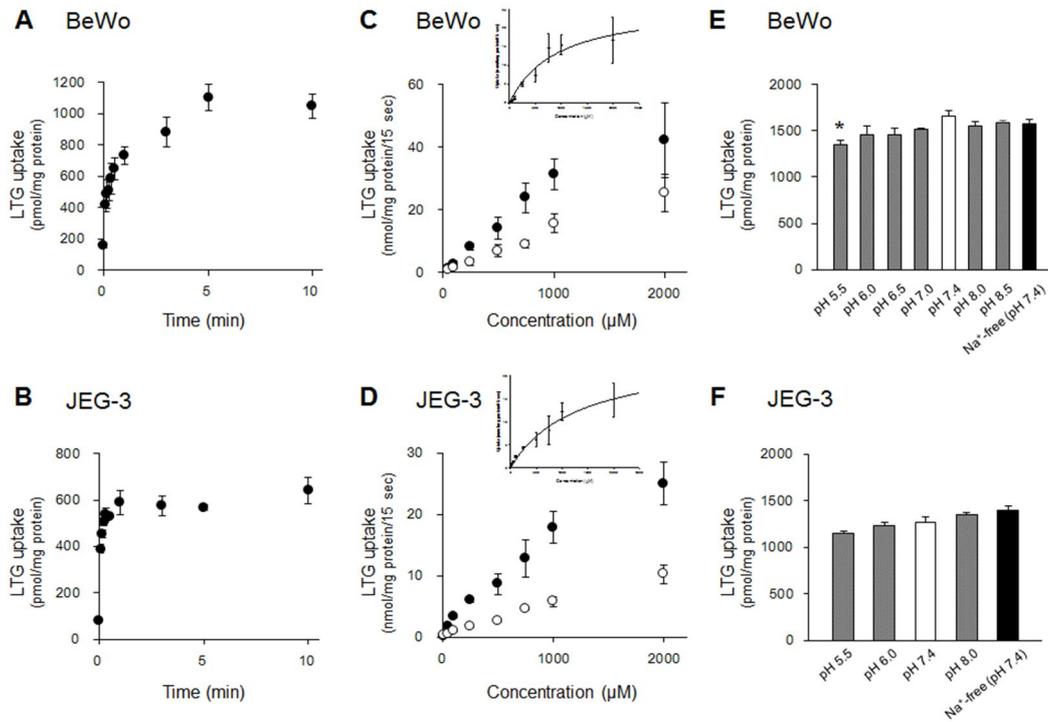


図5 BeWo 細胞および JEG-3 細胞における LTG の取り込み特性

(A, B) 時間依存性 Mean with SE (n=3-6)、(C, D) 濃度依存性 Mean with SE (n=3-4)、(E, F) pH および Na⁺の影響 Mean with SE (n=3). *: P < 0.05 when compared to the control (pH 7.4).

続いて、OCTs や OCTNs の阻害剤が LTG 輸送に及ぼす影響を評価した (表 2)。なお、吸着と受動拡散の影響を除くため、4°C における取り込みを引いた値を示した。Tetraethyl ammonium (TEA; OCT1, 2, OCTNs 阻害)、metformin (OCTs 阻害)、5-hydroxytryptamine (5-HT; OCT2 阻害)、choline (OCT2, OCTN2 阻害)、L-carnitine (OCTNs 阻害)、amantadine (OCT1, 2 阻害) は、BeWo 細胞および JEG-3 細胞の LTG 取り込みに影響を与えなかった。一方、chloroquine (OCT2 阻害)、imipramine (OCT2, 3 阻害)、quinidine (OCTs, OCTNs 阻害) は両細胞において有意な阻害効果を示した。また、verapamil (OCTs, OCTNs 阻害) は、BeWo 細胞における LTG 取り込みを有意に減少させ、JEG-3 細胞における取り込みも減少させる傾向を示した。先に示したように、両細胞にける OCTs 発現は、OCT1 が主要と考えられる (図 4A, B)。しかし、OCT1 siRNA によるノックダウンは、両細胞における LTG 取り込みに有意な影響を及ぼさなかった (data not shown)。さらに、ヒト満期胎盤において発現の多い OCT3 について、OCT3 を主要に発現する細胞を用いて予備検討を行った。OCT3 阻害剤である corticosterone による、LTG 取り込みの阻害は観察されなかった (data not shown)。これらの結果から、胎盤における LTG 輸送に OCTs が寄与する可能性は低いことが示された。また、OCTNs に関しては、細胞および組織において発現が確認されたものの、代表的な基質である L-carnitine による阻害効果および pH や Na⁺ による影響が観察されなかったことから、OCTNs が寄与する可能性も低いと考えられる。本検討において輸送担体の特定はできなかったものの、LTG の胎盤細胞への取り込みは、chloroquine, imipramine, quinidine, verapamil により阻害される担体が寄与することが示唆された。これら化合物の特徴として、構造中に 3 級アミンを有し、脂溶性が高く、生理的 pH でカチオンであることが考えられた。今後、正常細胞を用いた検討等さらなる評価を進め、胎盤移行に寄与する因子の特定を進めていく予定である。

本結果を基に、変動したトランスポータ、輸送に寄与するトランスポータについて、その基質や阻害剤の投与が及ぼす影響を評価することで、リスクを低減させる物質の探索に繋げる。本研究の進展は、抗てんかん薬のリスク評価および回避策の構築に貢献できるものと考えられる。

< 引用文献 >

- [1] Meador et al., *Lancet Neurol* 12:245-252 (2013).
- [2] Binkerd PE et al., *Fundam Appl Toxicol* 11:485-493 (1988).
- [3] Dickens D et al., *Biochem Pharmacol.* 83:805-814 (2012).
- [4] Jacob S et al., *Drugs R D.* 16:303-316 (2016).

表2 種々の化合物が LTG 輸送に及ぼす影響

Compounds	BeWo		JEG-3	
	mM	Carrier-mediated uptake (% of control)	mM	Carrier-mediated uptake (% of control)
Amantadine	1	85.5 ± 7.4	1	97.3 ± 7.2
L-Carnitine	1	89.7 ± 10.4	1	108.0 ± 14.8
Chloroquine	1	17.9 ± 4.0**	1	42.8 ± 2.5**
Choline	1	98.2 ± 12.2	1	108.1 ± 14.7
5-HT	1	94.1 ± 9.2	1	96.2 ± 9.2
Imipramine	1	28.4 ± 12.2**	0.5	56.4 ± 3.4**
Metformin	1	121.6 ± 16.1	1	109.2 ± 5.6
Quinidine	1	51.7 ± 10.1**	1	51.0 ± 9.0*
TEA	1	74.0 ± 14.1	1	113.0 ± 12.9
Verapamil	1	58.5 ± 7.4*	1	78.5 ± 9.3

Mean with SE (n=3-7). **: P < 0.01. *: P < 0.05.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nami Hasegawa, Ayako Furugen, Kanako Ono, Mai Koishikawa, Yuki Miyazawa, Ayako Nishimura, Takeshi Umazume, Katsuya Narumi, Masaki Kobayashi, Ken Iseki	4. 巻 -
2. 論文標題 Cellular uptake properties of lamotrigine in human placental cell lines: Investigation of involvement of organic cation transporters (SLC22A1-5)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Pharmacokinetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2020.01.005	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 Naoko Jinno, Ayako Furugen, Yuko Kurosawa, Yuki Kanno, Katsuya Narumi, Masaki Kobayashi, Ken Iseki	4. 巻 -
2. 論文標題 Effects of single and repetitive valproic acid administration on the gene expression of placental transporters in pregnant rats: An analysis by gestational period	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Reproductive Toxicology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2020.04.077	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長谷川 奈美、古堅 彩子、黒澤 優子、西村 あや子、鳴海 克哉、小林 正紀、井関 健
2. 発表標題 ヒト胎盤絨毛癌由来細胞におけるラモトリギンの輸送機構
3. 学会等名 第32回北海道薬物作用談話会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神野 菜緒子、古堅 彩子、黒澤 優子、菅野 裕希、鳴海 克哉、小林 正紀、井関 健
2. 発表標題 バルプロ酸がラット胎盤ABCトランスポーター発現に及ぼす影響
3. 学会等名 日本薬学会北海道支部第146回例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小野 佳菜子、古堅 彩子、黒澤 優子、神野 菜緒子、鳴海 克哉、小林 正紀、井関 健
2. 発表標題 多価不飽和脂肪酸が胎盤細胞のトランスポーター発現に及ぼす影響
3. 学会等名 日本薬学会北海道支部第146回例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神野 菜緒子、古堅 彩子、黒澤 優子、菅野 裕希、鳴海 克哉、小林 正紀、井関 健
2. 発表標題 パルプロ酸が胎盤SLCトランスポーター発現に及ぼす影響 妊娠期と性別による解析
3. 学会等名 第14回トランスポーター研究会年会
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