

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16430

研究課題名（和文）iPS細胞由来薬物胎盤透過性評価モデルによる包括的医薬品胎盤透過性比較評価

研究課題名（英文）Comprehensive drug placental permeability evaluation using iPS cells-derived drug placental permeability evaluation model

研究代表者

池田 賢二（IKEDA, Kenji）

大阪大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：10434812

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：我々はこれまでに、induced pluripotent stem cells (iPS)細胞を用いた胎盤薬物透過性モデルの構築に重要なシンシチオトロホプラスト細胞は、Retinoic Acid (RA)刺激により分化することを示してきた。また、本シンシチオトロホプラスト様分化iPS由来細胞層は、hCG分泌能を有し、タンパク発現などでも生体内に類似していることを明らかとした。さらに、コラーゲンType IVコーティングによって、医薬品の透過性評価が可能な層化を可能とし、医薬品の胎児移行性評価系として、各医薬品の胎盤関門透過係数、Fetal/Maternal比を測定できるレベルで構築された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

妊婦および胎児の薬物動態については、既存の動態モデル解析法から予測することは困難である。現在、胎児動態パラメータを予測するために妊婦生理学的薬物動態(PBPK)モデルが検討されているものの、薬物の胎児移行性評価に用いるモデルは満期胎盤による移行性パラメータなどの研究段階のものであり、妊娠時の胎児動態などを予測するには不十分である。本課題モデルの完成とPBPKモデル解析手法を組み合わせることで、各種医薬品の胎児移行性をはじめ、トランスポーター飽和など医薬品の胎盤透過性に係るパラメータを取得でき、ハーチャルツインを見据えた将来的な臨床応用が可能となるものと期待できる。

研究成果の概要（英文）：We have previously shown that syncytiotrophoblasts, which are important for constructing a placental drug permeability model using induced pluripotent stem (iPS) cells, can differentiate upon retinoic acid (RA) stimulation. In addition, it was clarified that this syncytiotrophoblast-like differentiated iPS-derived cell layer has the ability to secrete hCG and is similar to that in vivo in terms of protein expression. Moreover, the collagen type IV coating enabled monolayer construction that enables drug permeability evaluation, and as a fetal transfer evaluation system for drugs, it was constructed at a level that can measure the placental barrier permeability coefficient and fetal/maternal ratio of each drug.

研究分野：医療薬学

キーワード：薬物動態 iPS 胎児移行性 Placental transport Simcyp 胎盤関門 妊娠時薬物療法 トロホプラスト

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

(1) 妊娠時薬物療法における医薬品の胎盤薬物透過性比較評価の背景

倫理的背景によって治験段階では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、妊娠時薬物療法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。胎盤絨毛組織において物質透過の制御に関わる細胞層は、主にシンシチオトロホプラスト細胞層である。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、ベシクル膜を使用した薬物の細胞内取り込み、薬物透過へのトランスポーターの関与などの報告があるが、未だ胎児移行性をよく示す指標としての意義が明確ではない。胎盤薬物透過性評価モデルには、シンシチオトロホプラスト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。このような背景を踏まえて、これまでにトロホプラスト様ヒト絨毛癌細胞株 JEG-3 (NJEGs)を用いて分化条件を検討し、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(DJEGs)を確立してきた¹⁻³⁾。しかしながら、特に influx transporter の機能面などで *in vivo* を反映できていない細胞特性があることが明らかとなった。そこでさらに *in vivo* 類似性を高めるために、新規分化 iPS *in vitro* 薬物胎盤透過性評価モデルの構築が必要である。

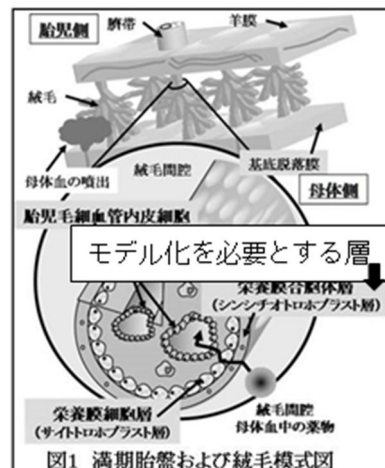


図1 満期胎盤および絨毛模式図

(2) 妊娠時薬物動態モデル検討の背景

妊婦および胎児の薬物動態は、既存の動態モデル解析法から予測することは困難である。現在、胎児動態パラメータを予測するために妊婦生理学的薬物動態モデルが検討されているものの、d)、薬物の胎児移行性評価に用いるモデルは満期胎盤による移行性パラメータを利用する他なく、妊娠時の胎児動態を予測するには不十分である。

2. 研究の目的

周産期薬物療法では催先天異常性、服薬時期など医療の適正向上のために加減すべき因子が複雑に交差する。特にヒト薬物胎児移行性および胎児毒性の情報が乏しく、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。しかしながら、未だ適切に *in vivo* を反映し得る薬物胎児移行性評価モデルが確立されていない点が現在の学術的問題点である。この問題点を解決するために、まず胎盤における物質透過を制御している絨毛組織の最外殻層、胎盤閉門の主要層であるシンシチオトロホプラスト層を正確に表現し得る新規分化 iPS 細胞由来 *in vitro* 薬物胎盤透過性評価モデルを確立することを目的とする。さらに、本モデルを用いた薬物胎盤透過性評価を実地医療において有意義に活用するために、妊娠時の薬物動態解析に医薬品の胎盤透過係数を組み込むことで、胎児コンパートメントを考慮した解析法を考案することを最終目標とする。

本モデルと動態解析手法の融合によって、各種医薬品の胎児移行性をはじめ、シンシチオトロホプラスト薬物代謝能力、トランスポーターの飽和など医薬品の胎盤透過性に係るパラメータを取得できるものと期待できる。

3. 研究の方法

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制度を検討できるひとつの分化指標であるため、細胞層完全性の指標とした。またサイトトロホプラストは、シンシチオトロホプラストへと分化することにより排出トランスポーター P-glycoprotein (Pgp/ABCB1) の発現が抑えられ、Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)、not-expressed choriocarcinoma 1 (NECC1) の発現誘導が認められている。

これまでに得ている Retinoic acid (RA) による分化 iPS 細胞由来 *in vitro* 薬物胎盤透過性評価モデル⁴⁾ は、シンシチオトロホプラスト指標である hCG 分泌において、BMP4 刺激に劣らなかった。そこで、上述のシンシチオトロホプラスト分化指標の検証によって各種 RA 刺激条件を比較検討し、医薬品の胎児移行性を反映しうる新たな分化 iPS 細胞由来 *in vitro* 薬物胎盤透過性評価モデルを見出す。さらに本モデルによって各種医薬品の胎盤透過係数を得ることによって、新規胎児コンパートメント動態解析法を考案する。僅かながら妊娠時薬物動態に関する生理学的薬物動態モデルが検討されているが、満期胎盤を用いた胎児移行性パラメータを用いるしかなく、臨床上妊娠時薬物療法に応用できる動態モデルは未知である。したがって、より妥当性の高い胎児薬物動態モデル解析が必要であり、本モデルから得られた胎盤透過係数をパラメータとして利用し得る解析法考案のために、生理学的速度論 (Physiologically based

pharmacokinetic: PBPK)モデル解析ソフト Simcyp™ Simulator (Certara 社)を導入し、腸管吸収のモデル因子となった Caco-2 細胞層透過係数に類する、胎児移行性評価の可能性を探索する。また、胎盤透過係数を組み込んだ薬物動態モデル解析、およびモデル評価は、非線形混合効果モデル(Nonlinear Mixed Effect Model)解析ソフト NONMEM®または、Non-compartment 解析(NCA)も可能な Phoenix® WinNonlin™ によって可能とした。

4. 研究成果

iPS 細胞を 0.5 μM の Retinoic acid (RA)により刺激することで、シンシチオトロホプラスト様細胞に分化することが確認され(図 2)、機能確認のために胎盤において特異的に分泌される hCG の分泌能を指標として、RA 刺激期間による分化維持能への影響および生体内類似性を検討した。また、得られた細胞層のタイトジャンクション(TJ)形成能を評価するために、Trans-epithelial electric resistance (TEER)値を継続的に測定し、細胞層の完全性を同時評価した。RA 刺激シンシチオトロホプラスト様細胞層の TEER 値がコラーゲン膜と同程度を示したことから、細胞層に未接着領域が存在すること、イオン透過が制限されていない可能性があることが示唆された。

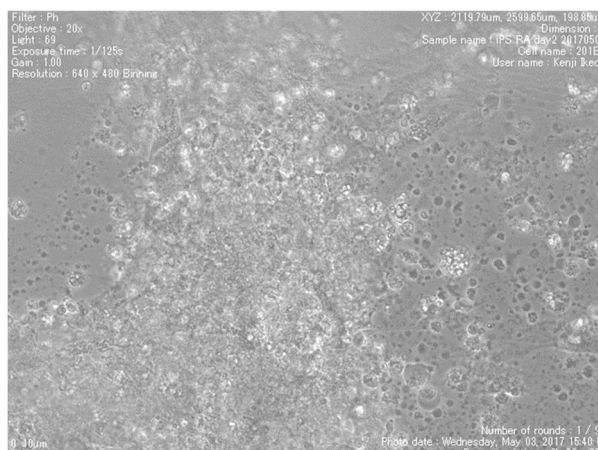


図 2. RA 分化 iPS 由来シンシチオトロホプラスト様細胞層

しかしながら、RA 刺激のみでは 1 週間程度しか分化維持できないため、モデルとしての適正に問題があった。そこで安定分化を目的として、スタウロスポリン/デキサメタゾン(St/Dex)を用いた分化条件を検討した。iPS メンテナンス培養のネガティブコントロール群(NC 群)と RA 刺激によるポジティブコントロール群(PC 群) および St/Dex 処理後 RA 刺激群を比較評価した。hCG 分泌期間は PC 群と St/Dex 処理群で有意差は認められず、分泌期間は RA 添加から約 1 週間程度であった。Day 13 の hCG 分泌量を ELISA 法により測定した結果、hCG 分泌量は St/Dex3 日間処理が PC 群と比べ多く分泌されていた。このことから St/Dex3 日間処理は hCG 分泌量を増加させた可能性がある。また St/Dex3 日間処理群の細胞は細胞同士が結合し合胞体を形成している形態変化が認められた(図 3-5)。以上のことから St/Dex 処理後 RA 刺激は分化後の維持期間を延長しなかったものの機能的分化を促進すると考えられた。

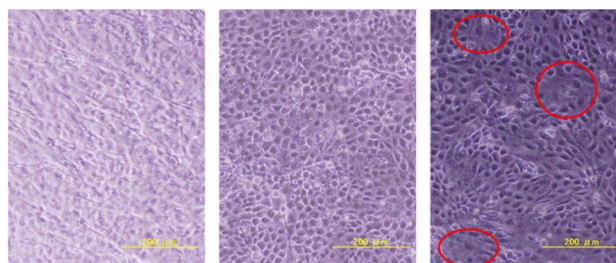


図 3 day 15 NC 群 100倍率 hCG分泌量 0 mIU/mL
図 4 Day 15 PC 群 100倍率 hCG分泌量 5.53 mIU/mL
図 5 Day 15 St/Dex (3) 処理群 100倍率 hCG分泌量 39.57 mIU/mL

今回、分化 iPS 細胞による医薬品の胎盤透過評価系が、医薬品の透過係数、Fetal/Maternal 比を測定できるレベルで構築された。そこで、*in vitro* から *in vivo* への外挿をシミュレートするに適した生理学的速度論(Physiologically based pharmacokinetic: PBPK)モデル解析ソフト Simcyp™ Simulator (Certara 社)を導入し、腸管吸収のモデル因子となった Caco-2 細胞層透過係数に類する、胎児移行性評価の可能性を探索する段階に至った。

今後の課題として、RA 刺激シンシチオトロホプラスト様細胞を安定的に培養するために、分化状態を長期維持する因子を検討していく必要がある。また、同時に臨床応用に向けた PBPK モデル解析手法の確立に向けて取り組む。

参考文献

1. Carrier-Mediated Placental Transport of Cimetidine and Valproic Acid across Differentiating JEG-3 Cell Layers, Ikeda K et.al., Pharmazie, 70:471-476, 2015.
2. Efflux transporter mRNA expression profiles in differentiating JEG-3 human choriocarcinoma cells as a placental transport model, Ikeda K et.al., Pharmazie, 67:86-90, 2012.
3. In Vitro Approaches to Evaluate Placental Drug Transport by Using Differentiating JEG-3 Human Choriocarcinoma Cells, Ikeda K et.al., Basic Clin. Pharmacol. Toxicol., 108:138-145, 2011.
4. Approach for Differentiating Trophoblast Cell Lineage from Human Induced Pluripotent Stem Cells with Retinoic Acid in the Absence of Bone Morphogenetic Protein 4., Ikeda K. et.al., Placenta, 71C:24-30, 2018.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 池田 賢二
2. 発表標題 TDM国内QCサーベいの紹介と今後の展望
3. 学会等名 第37回日本TDM学会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池田 賢二
2. 発表標題 2020年度抗がん薬TDMコントロールサーベイ結果報告
3. 学会等名 第6回TDM-QC研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池田 賢二
2. 発表標題 周産期医療と薬物療法
3. 学会等名 2022年度 大阪大学薬学部・薬友会 卒後研修会第3回（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 竹末芳生、池田賢二、木村利美、加藤隆児他	4. 発行年 2022年
2. 出版社 公益社団法人日本化学療法学会	5. 総ページ数 216
3. 書名 抗菌薬TDM臨床実践ガイドライン	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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