

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07149

研究課題名（和文）胎盤移行性および胎盤機能を指標とした抗不安・睡眠薬のリスク評価

研究課題名（英文）Risk assessment of the use of anti-anxiety and hypnotic drug during pregnancy on placental trophoblastic functions

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、抗不安・睡眠薬の中でもBenzodiazepine (BZ) 受容体作動薬の胎盤機能に対する影響を評価した。In vitroにおいて、17種類のBZの蓄積性の違いを示し、P-gp機能にBZは影響しないことを明らかにした。また、妊娠期の毒性が知られているvalproic acidを用いて、ホルモン分泌・分化能を指標とした評価の妥当性を検討した。本評価系を用いて、BZは、ホルモン分泌・分化能に影響しないことを示した。さらに、ヒト胎盤の分化関連遺伝子・胎盤ホルモン発現と新生児・胎盤パラメーターの関連を評価し、MFSD2Aと各種パラメーターの間に正の相関があることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、胎盤の多彩な生理機能に着目し、抗不安・睡眠薬の1つであるBenzodiazepine (BZ) 受容体作動薬の影響を包括的かつ多面的に評価した。一般的に、妊娠期の女性を対象とした臨床試験はハードルが高く、胎児へのリスク評価や回避に関わる基礎情報は重要であると考えられる。また、近年、周産期メンタルヘルスケアの重要性が着目されており、精神科系薬剤のリスク評価ならびに薬剤選択に関わる情報構築が望まれる。今後も更なる研究を進めるとともに、新規の睡眠薬に関する検討を行うことで、抗不安・睡眠薬の妊娠期の安全性に関する情報の構築、ならびに児のリスク低減に向けた方策の提案に繋げたい。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on benzodiazepine (BZ) receptor agonists and their transfer to placental trophoblast. We evaluated the effects of BZs on transporter function, hormone secretion, and differentiation. Differences in the accumulation of 17 types of BZs were observed in vitro. Our findings indicated that BZs had no effect on P-gp function. Moreover, the validity of hormone secretion and differentiation potential was evaluated as indices using valproic acid, a drug with reported risks for use during pregnancy. Using this evaluation system, we found that clobazam did not affect hormone secretion or the differentiation potential of trophoblasts. Furthermore, using human placental samples, we evaluated the relationship between differentiation-related genes and neonatal/placental parameters. A positive correlation was found between MFSD2A and the parameters. Further investigation will contribute to understanding the use of anxiolytic and sleep medications during pregnancy.

研究分野：医療薬学

キーワード：胎盤 Trophoblast 抗不安・睡眠薬 Benzodiazepine

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胎盤は、物質輸送、ホルモン分泌、分化能等の多彩な機能を有しており、胎児の発育・妊娠の維持に関与する。これらの機能は、胎盤における trophoblast 細胞が重要な役割を担っており、cytotrophoblast (CT) および融合・多核化した syncytiotrophoblast (ST) への正常な分化が必須である。一方、妊娠時の薬物治療では、治療中止が母体へ及ぼす影響と、薬剤が胎児へ及ぼすリスクの両方を考慮する。近年、周産期メンタルヘルスケアの重要性が着目されており、精神科系薬剤のリスク評価ならびに薬剤選択に関わる基礎情報は重要である。特に、精神疾患を有する妊婦の場合、抗不安・睡眠薬を含めた複数の薬剤が使用される場合もある。Benzodiazepine (BZ) 受容体作動薬は、本邦において広く使用されている抗不安・睡眠薬である。また、近年、メラトニン受容体作動薬 (Ramelteon) やオレキシン受容体拮抗薬 (Suvorexant, Lemborexant) などの新規の睡眠薬も使用される。しかし、これら薬剤の妊娠期の安全性に関する包括的なデータは十分ではない。

2. 研究の目的

本研究は、抗不安・睡眠薬の胎盤への移行特性を明らかにするとともに、胎盤機能への影響についても多面的に検討することにより、妊娠期の安全性に関する基礎情報を構築することを目的とした。研究計画として、「I. 胎盤 trophoblast への移行性の解析」「II. 物質輸送能に及ぼす影響の評価」「III. ホルモン分泌能・分化能に及ぼす影響の評価」について検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 使用細胞

胎盤モデルとして、ヒト胎盤絨毛癌由来 BeWo 細胞、および、近年 Okae らにより樹立されたヒト胎盤幹細胞 (TS)¹⁾ を使用した。分化に及ぼす影響の評価では、BeWo 細胞から ST 様細胞への分化を誘導するため、forskolin (FK) を用いた。また、TS 細胞 (TS^{CT}) から ST 様細胞 (ST-TS^{CT}) への分化を誘導するため、TS^{CT} 細胞を ST 培地中で 72 時間培養し、検討に用いた。

(2) 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、直ち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。

(3) 取り込み実験

BZ の細胞への取り込みの評価

BeWo 細胞における評価を行った。培養液を除去後、細胞を 37°C に温めた transport buffer で洗浄し、プレインキュベーションした。その後、細胞に薬液を添加し、37°C で 30 分間インキュベートした。各薬剤の濃度は 0.5 μM に設定した。薬液を吸引し、氷冷した transport buffer にて洗浄することで、反応を停止させた。細胞内薬物濃度の定量には、LC/MS/MS を用いた。細胞内への取り込み量は、BCA 法で定量したタンパク質量で補正した。

排出トランスポーターの機能評価

ST-TS^{CT} 細胞を使用し、胎盤のバリアとして重要な P-glycoprotein (P-gp) の輸送機能へ及ぼす影響を評価した。培養液を除去後、細胞を 37°C に温めた transport buffer で洗浄し、各薬剤 (BZ: 0.5 μM もしくは P-gp 阻害剤: Elacridar 5 μM) を含む transport buffer で、プレインキュベーションした。その後、P-gp 基質である Rhodamine123 (2 μM) および各薬剤を含む transporter buffer を添加し、37°C で 60 分間インキュベートした。薬液を吸引し、氷冷した transport buffer にて洗浄することで、反応を停止させた。細胞を溶解した後、プレートリーダーで蛍光強度を測定 (励起波長/蛍光波長: 485/538 nm) することで、蛍光基質の細胞内蓄積レベルの評価を行った。

(4) Quantitative PCR (qPCR)

細胞およびヒト胎盤から 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。qPCR は、KAPA SYBR Fast qPCR Kit を用い、反応および検出には Mx3000PTM もしくは Mx3005TM Real-time PCR System (STRATAGENE) を使用した。

(5) ヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) 分泌量測定 (ELISA)

薬液を添加し、規定時間培養した後、培養液を回収した。hCG 分泌量測定には、human hCG ELISA Kit (Abcam) を使用した。

(5) 免疫染色 (Fusion assay)

細胞を PBS で洗浄した後、4%ホルムアルデヒド溶液で固定した。ブロッキングを行った後、一次抗体 E-cadherin (Cell Signaling Technology) を加えて 4°C で一晩反応させた。翌日、二次抗体

Alexa Fluor® 488 標識ヤギ抗ウサギ IgG を加えて反応させた。核染色には DAPI を使用した。染色像は FluoView FV10i (Olympus) を用いて観察した。細胞融合の指標となる fusion index は、過去の報告²⁾に基づき算出した。

4. 研究成果

(1) 抗不安・睡眠薬の胎盤細胞への移行性の評価

ヒト胎盤細胞株 (BeWo 細胞) における 17 種類の BZ の取り込み量を評価した。細胞への蓄積量は、lorazepam, ethyl loflazepate 代謝物, clonazepam, clonazepam, ethyl loflazepate, diazepam, nitrazepam, zolpidem, eszopiclone, triazolam, brotizolam, etizolam, estazolam, alprazolam, flunitrazepam, clobazam の順となり、薬剤により膜透過性は異なることが示された (Fig. 1)。また、薬剤の各種物性 (分子量, Log P, イオン型分率, topological polar surface area, complexity) と蓄積量の関連性について評価した。統計解析 (Pearson's correlation test) において、有意な結果ではなかったものの、Log P と蓄積量に正の相関の傾向が示された。今回評価した因子の中では、脂溶性が蓄積量と関連することが示唆された。

(2) 物質輸送能に及ぼす影響の評価

ST-TS^{CT} 細胞を使用し、胎盤のバリアとして重要な P-glycoprotein (P-gp) の輸送機能へ及ぼす影響を評価した。P-gp 基質である Rhodamine 123 の蓄積は、阻害薬である Elacridar (5 μM) により増加することを確認した (Fig. 2 左)。一方、各種 BZ による影響は観察されなかったことから (Fig. 2 右)、BZ は胎盤 P-gp 機能に影響しないことが示唆された。なお、その他の排出トランスポーター (BCRP, MRPs) についても同様の検討を進めている段階である。

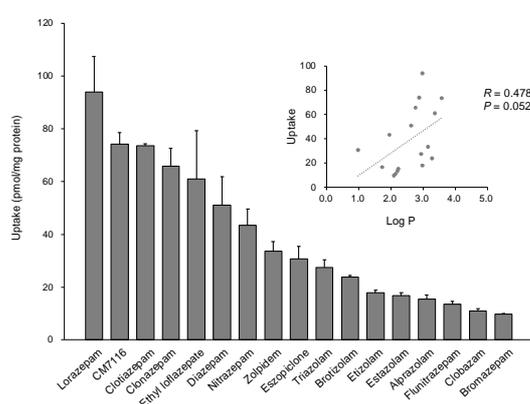


Fig.1 BeWo 細胞における BZ 蓄積量
Mean with S.E.

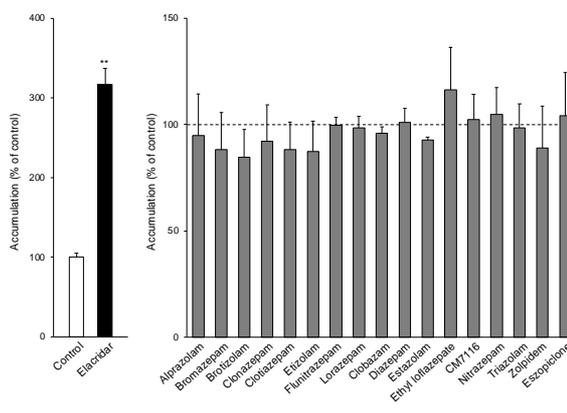


Fig.2 ST-TS^{CT} 細胞における Rhodamine 123 の蓄積量
Mean with S.E. **: $P < 0.01$.

(3) ホルモン分泌能・分化能を指標とした評価

始めに、妊娠期の使用におけるリスクが報告されている薬剤の一つとして、valproic acid (VPA)^{3,4)}を用いて検討を行った。BeWo 細胞における、分化関連・ホルモン遺伝子の発現変動を qPCR にて確認した (Fig. 3)。FK により BeWo 細胞を分化させたところ、syncytin-1, 2 および β-hCG の mRNA 量は増大し、connexin-43, ASCT2, MRP4, hPL 量は減少することが確認された。また、VPA はこれら分化による mRNA 変動に対して抑制的に働くことが示された。

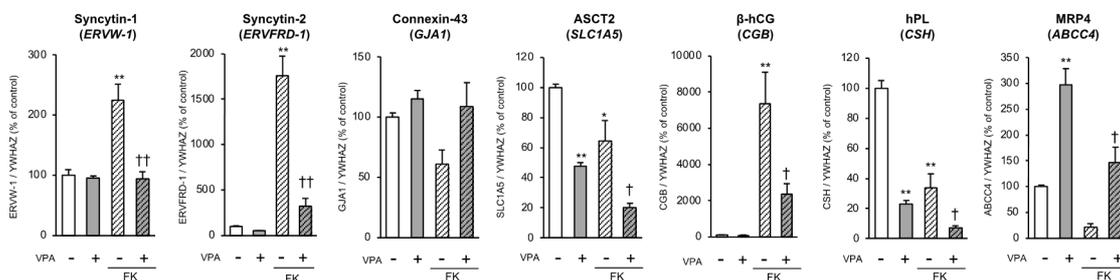


Fig.3 Valproic acid (VPA) が BeWo 細胞の分化関連・ホルモン遺伝子発現に及ぼす影響
Mean with S.E. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the control. † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$ compared to FK alone.

また、VPA が hCG 分泌量に及ぼす影響について ELISA を用いて評価した。FK によって hCG タンパク質の分泌は増大し、VPA によって減少することが確認された (Fig. 4A)。さらに、VPA が BeWo 細胞の細胞融合能に及ぼす影響を免疫染色 (fusion assay) にて評価した。細胞接着に関与する E-cadherin (緑)、核を DAPI (青) で染色し、全細胞核の数に占める融合細胞核の数を fusion

index として算出した。その結果、未分化条件下では単核細胞が多数を占めること、FK により細胞融合することが確認された。FK により fusion index は増大し、VPA によって細胞融合が抑制される傾向が示された (Fig. 4B)。

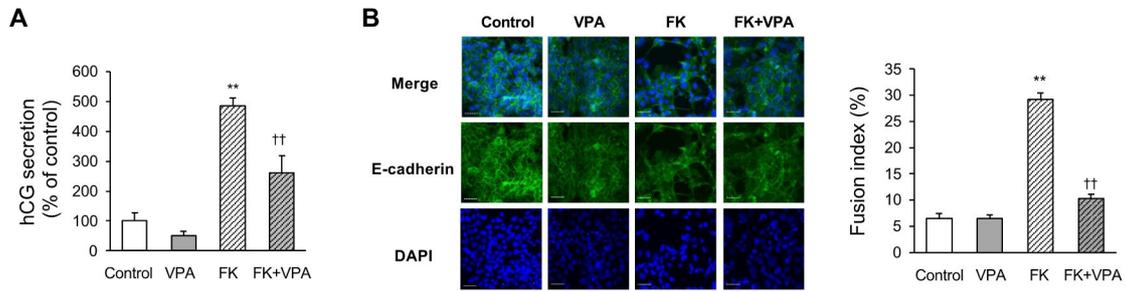


Fig.4 Valproic acid (VPA) が BeWo 細胞の hCG 分泌 (A) および細胞融合 (B) に及ぼす影響
Mean with S.E. ** $p < 0.01$ compared with the control. †† $p < 0.01$ compared to FK alone.

続いて、ST-TS^{CT} において、ホルモン分泌能・分化能を指標とした評価を行った。VPA の処理により、syncytin-1, 2 の mRNA 発現量は減少する一方で、connexin-43 発現量は増加することが確認された。また、hCG および hPL の mRNA 発現量が減少傾向を示すことが確認された。Syncytin の転写因子である GCM1、syncytin-1 の受容体である ASCT2 は、VPA による発現変動は観察されなかった。Syncytin-2 の受容体である MFSD2A は、VPA により発現量が減少することが確認された。また MRP4 は、VPA により発現量が増加した。変動の幅に差が生じたものの、これらの発現傾向は、先に示した BeWo 細胞における傾向と類似していた。

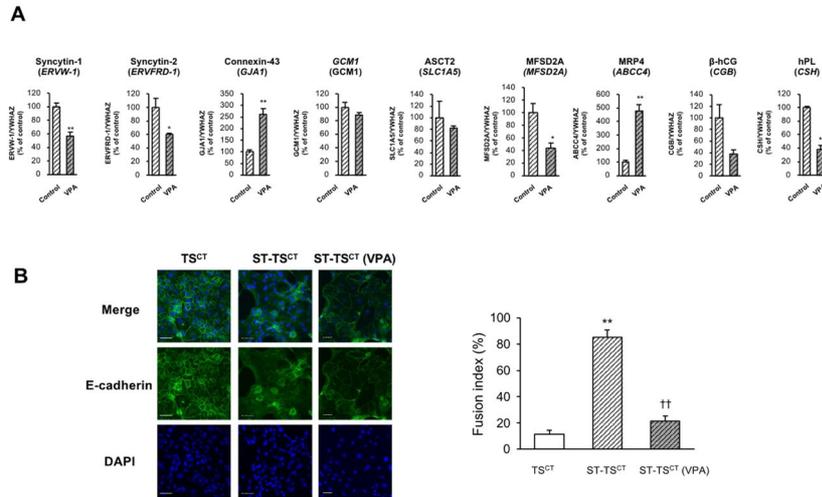


Fig. 5 Valproic acid (VPA) が ST-TS^{CT} 細胞における分化関連・ホルモン遺伝子発現 (A) および細胞融合 (B) に及ぼす影響. Mean with S.E. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the control. †† $p < 0.01$ compared to ST-TS^{CT}.

また、本研究では、ヒト胎盤絨毛における各種マーカーの発現量と、新生児・胎盤の身体パラメーターとの関連性を評価した (Fig. 6)。身体パラメーターとして出生児の体重・身長・頭囲・胸囲および胎盤重量を診療録より得て解析した。その結果、MFSD2A (MFSD2A) と体重・頭囲・胸囲・胎盤重量の間には正の相関関係があること、β-hCG (CGB) と頭囲、MRP4 (ABCC4) と胎盤重量の間には負の相関関係があることが示された。特に良好な相関を示した MFSD2A について Fig. 6 右に詳細を示した。今後、これらのマーカーが薬剤の毒性予測に応用できるか、評価を行っていく予定である。

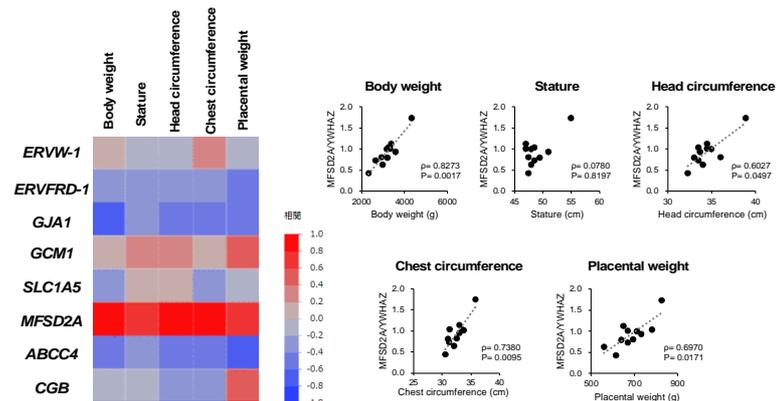


Fig.6 ヒト胎盤における各種マーカー発現量と、新生児・胎盤パラメーターの関連性

最後に、BZ のうち clobazam (CLB) 曝露による影響を評価した。その結果、各種分化マーカー・ホルモン遺伝子に対して CLB は影響を及ぼさないことが示された。これらの結果から、BZ は胎盤のホルモン分泌能・分化能には影響を及ぼさない可能性が示された。

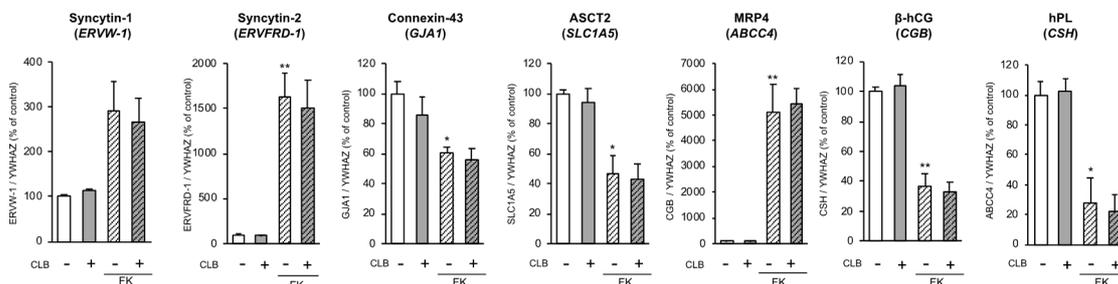


Fig.7 Clobazam (CLB)が BeWo 細胞の分化関連・ホルモン遺伝子の発現に及ぼす影響
Mean with S.E. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the control.

以上、本研究では、抗不安・睡眠薬の中でも、Benzodiazepine (BZ) 受容体作動薬に着目し、「I. 胎盤 trophoblast への移行性の解析」「II. 物質輸送能に及ぼす影響の評価」「III. ホルモン分泌能・分化能に及ぼす影響の評価」について検討を行った。今後も更なる研究を進めるとともに、新規薬に関する検討も併せて行うことで、抗不安・睡眠薬の妊娠期における使用に関する情報の構築、ならびに児のリスク低減に向けた方策の提案に繋げたい。

5 . 参考文献

- 1) Okae H, Toh H, Sato T, Hiura H, Takahashi S, Shirane K, Kabayama Y, Suyama M, Sasaki H, Arima T. Derivation of Human Trophoblast Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2018;22(1):50-63.e6.
- 2) Clabault H, Flipo D, Guibourdenche J, Fournier T, Sanderson JT, Vaillancourt C. Effects of selective serotonin-reuptake inhibitors (SSRIs) on human villous trophoblasts syncytialization. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2018;349:8-20.
- 3) Meador KJ, Baker GA, Browning N, Cohen MJ, Bromley RL, Clayton-Smith J, Kalayjian LA, Kanner A, Liporace JD, Pennell PB, Privitera M, Loring DW; NEAD Study Group. Fetal antiepileptic drug exposure and cognitive outcomes at age 6 years (NEAD study): a prospective observational study. *Lancet Neurol*. 2013;12(3):244-52.
- 4) Christensen J, Grønberg TK, Sørensen MJ, Schendel D, Parner ET, Pedersen LH, Vestergaard M. Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. *JAMA*. 2013;309(16):1696-703.

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 古堅 彩子	4. 巻 140
2. 論文標題 妊娠・授乳期の適切な薬物治療に向けた母体-胎児・乳児間の物質移行に関する研究	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 1199 ~ 1206
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/yakushi.20-00140	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 Nanami Ohyama, Ayako Furugen, Riko Sawada, Ryoichi Aoyagi、Ayako Nishimura, Takeshi Umazume、Katsuya Narumi、Masaki Kobayashi	4. 巻 474
2. 論文標題 Effects of valproic acid on syncytialization in human placental trophoblast cell lines	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Toxicology and Applied Pharmacology	6. 最初と最後の頁 116611 ~ 116611
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.taap.2023.116611	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 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大山 七海、古堅 彩子、澤田 理子、西村 あや子、鳴海 克哉、小林 正紀
2. 発表標題 胎盤Trophoblastの分化・ホルモン分泌機能に着目した薬剤の影響評価
3. 学会等名 第32回日本医療薬学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ayako Furugen, Nanami Ohyama, Yuki Miyazawa, Mai Koishikawa, Naoko Jinno, Kanako Ono, Yuko Kurosawa, Nami Hasegawa, Katsuya Narumi, Masaki Kobayashi
2. 発表標題 Risk assessment of the use of antiepileptic drugs during pregnancy on placental trophoblastic functions
3. 学会等名 第15回次世代を担う若手のための医療薬科学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古堅 彩子
2. 発表標題 周産期における精神神経疾患治療への貢献を目指した医療薬科学研究
3. 学会等名 第17回次世代を担う若手のための医療薬科学シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 古堅 彩子
2. 発表標題 定量・毒性解析を基盤とした、妊娠・授乳期の薬物治療における安全性評価
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024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

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