

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890246

研究課題名（和文） 胎児栄養環境維持における血液胎盤関門制御機構の包括的解明と表現型変動との相関

研究課題名（英文） Regulation mechanisms of the placental barrier for the maintenance of the fetal environment and their relevancies to the phenotype

研究代表者

登美 齊俊 (TOMI MASATOSHI)

慶應義塾大学・薬学部・講師

研究者番号：30334717

研究成果の概要（和文）：

血液胎盤関門は胎児への物質移行を制御することで胎児環境維持を担うため、その機能制御機構の解明は重要である。本研究では、(1)血液胎盤関門への分化、(2)妊娠糖尿病モデルラット、(3)妊娠期低栄養モデルラットにおける血液胎盤関門トランスポーターの発現制御をそれぞれ明らかにした。本研究結果は、血液胎盤関門が母体栄養環境や胎盤分化過程に対応して胎児環境維持に向けたトランスポーター等の発現制御を受けることを具体的に示す重要な知見である。

研究成果の概要（英文）：

The placental barrier regulates fetal transfer of maternal substances and thus maintains fetal environment. Therefore, it is important to elucidate functional regulations at the placental barrier. In this study, we clarified regulations of transporter expression at the placental barrier by (1) differentiation to the placental barrier, (2) gestational diabetes, and (3) caloric restriction. These results represent that the molecular expression at the placental barrier are regulated by placental differentiation and maternal nutrition environment in order to maintain fetal environment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010年度	970,000	291,000	1,261,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,040,000	612,000	2,652,000

研究分野：薬剤学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：胎盤関門、トランスポーター、発現制御

1. 研究開始当初の背景

血液胎盤関門は胎児への栄養供給を制御することで胎児環境を直接規定する。血液胎盤関門を介した物質透過を制御するため、胎盤関門の母体側および胎児側細胞膜には、栄養物や薬物を基質とする種々のトランスポーターが発現していることが知られている。胎盤は妊娠に伴い急速に発達し、さらに妊娠

時期や環境変化に適応してその構造、機能をダイナミックに変動させる。そのため、胎盤関門トランスポーターについても、妊娠経過や環境変化に伴い、発現制御を受けると考えられるが、不明な点が多い。

血液胎盤関門は胎盤絨毛 cytotrophoblast が syncytiotrophoblast へと分化融合することで形成される。Syncytiotrophoblast への

分化過程には cAMP/Protein kinase A (PKA) 経路の関与が報告されており、PKA 依存的な分化融合過程における関門トランスポーター群の発現制御機構を解明することは、血液胎盤関門形成機構を理解する上で重要である。

重篤な妊娠糖尿病における子宮内胎児発育不全の発症機構に臍帯血管収縮が提唱されており、血管収縮にも関与するアデノシンの胎盤における輸送機構の解明は重要である。これまでに血液胎盤関門において母体血からの取込み輸送にヌクレオシドトランスポーターである *equilibrative nucleoside transporter (ENT) 1(Slc29a1)* および *ENT2(Slc29a2)* がアデノシン輸送に主に関与することを示されている。一方、妊娠糖尿病においてアデノシンへの胎児供給に関わるトランスポーターがどのような発現制御を受けているかは不明であり、子宮内胎児発育不全との関連性を踏まえ、その解析を行うことは重要である。

我が国では痩せ願望に起因する妊娠適齢期女性の低栄養状態、および妊娠糖尿病予防のための妊婦体重増加の制限などに伴い低出生体重児出生率が増加傾向にある。胎児期における低栄養環境は生活習慣病発症におけるリスク因子となることが、数多く報告されている。低栄養環境に曝された場合、胎児ではエネルギーを効率的に利用可能な代謝系が構築される。しかし、出生後にその代謝系にとって過剰な栄養環境におかれることで生活習慣病リスクが上昇すると考えられている。そのため、良好な胎児期栄養環境を維持することが、胎児の出生後の生涯にわたる健康を確保するために重要である。しかし、胎内栄養環境を直接規定する血液胎盤関門について、低栄養環境下における機能変化および、その母体・胎児への影響解析は十分ではない。そのため、妊娠時低栄養環境が引き起こす胎盤における遺伝子発現変動を包括的に解析し、さらにその遺伝子発現変動が母体、胎盤、胎児における栄養物質濃度に与える影響を解析することが必要である。

2. 研究の目的

本研究では、(1)血液胎盤関門への分化過程における遺伝子発現制御、(2)妊娠糖尿病モデルラット胎盤におけるアデノシントランスポーターの発現制御、(3)妊娠期低栄養モデルラット胎盤における遺伝子発現および栄養物質濃度変動をそれぞれ解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 血液胎盤関門への分化過程における遺伝子発現制御：

未分化 *cytotrophoblast* モデルであるヒト

絨毛癌由来 JEG-3 細胞を *forskolin* 処理により *syncytiotrophoblast* 様細胞に分化誘導し、DNA マイクロアレイおよびリアルタイム定量 PCR 法を用いて遺伝子発現量を網羅的に解析した。また *dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS)* および *estrone-3-sulfate (E₁S)* 輸送活性を解析した。

(2) 妊娠糖尿病モデルラット胎盤におけるアデノシントランスポーターの発現制御：

妊娠ラットに *streptozotocin* を投与し、妊娠糖尿病モデルラットとした。胎盤におけるトランスポーター遺伝子を定量 RT-PCR によって解析した。また、胎盤刷子縁膜 (母体側) ベシクル(BBMV)を調製し、母体側細胞膜におけるアデノシン輸送活性を解析した。

(3) 妊娠期低栄養モデルラット胎盤における遺伝子発現および栄養物質濃度変動：

妊娠 8 日目から摂取カロリーを 50% に制限した妊娠期低栄養モデルラット (低栄養群) を作成し、自由に餌を摂取させた対照群と共に、妊娠 19 日目に胎盤および母体・胎児血漿を採取した。DNA マイクロアレイおよびリアルタイム定量 PCR 法を用いて胎盤における遺伝子発現量を網羅的に解析した。また、胎盤および母体・胎児血漿中グルコース濃度を測定した。

4. 研究成果

(1) 血液胎盤関門への分化過程における遺伝子発現制御：

Forskolin 存在下で培養した JEG-3 細胞において、*syncytiotrophoblast* マーカーである *human chorionic gonadotropin-8* 分泌および *syncytin mRNA* 発現は顕著に増加し、*syncytiotrophoblast* 様細胞への分化が示された。*Forskolin* 存在下で培養した JEG-3 細胞において、*organic anion transporter (OAT) 4 (SLC22A11)* mRNA の発現量は有意に増加し、その基質である *DHEAS* および *E₁S* 取り込み活性についても有意に上昇した。一方、胎盤における発現が報告されている他の有機アニオントランスポーター *organic anion transporting polypeptide (OATP) 2B1 (SLC21A9)*、*organic solute carrier protein (OSCP) 1* および *sodium-dependent organic anion transporter (SOAT) 1 (SLC10A6)* は *forskolin* 添加による発現変動を受けなかった。さらに、*forskolin* が *OAT4* の発現および機能に与える誘導効果は、PKA 阻害剤 *KT5720* との併用によって阻害された。したがって、血液胎盤関門における *OAT4* の発現には、*syncytiotrophoblast* への分化過程における PKA を介した発現誘導機構が関与していることが示唆された。*OAT4* は *syncytiotrophoblast* 胎児側膜において機能

し、薬物胎児移行性にも影響を与えるのみでなく、胎児で産生された DHEAS 等をエストロゲン前駆体として胎盤内に取り込むことで胎盤エストロゲン合成に関与することが示唆されている。胎児で産生された過剰な DHEAS の蓄積は子宮内胎児発育不全の発症と関連があることも報告されている。したがって、OAT4 は妊娠維持に重要な血液胎盤関門トランスポーターであり、分化過程において発現誘導を受けると考えられる。

DNA マイクロアレイによる解析の結果、JEG-3 細胞を forskolin 存在下で培養することによって OAT4 に加えて、concentrative nucleoside transporter (CNT) 2 (SLC28A2)、cationic amino acid transporter (Cat) 1 (SLC7A1)、breast cancer resistant protein (BCRP/ABCG2)、facilitated glucose transporter (GLUT) 1 (SLC2A1)などのトランスポーター mRNA 量が増加することが明らかとなった。これらトランスポーターについても、分化過程において発現誘導を受けることで血液胎盤関門を介した物質輸送において重要な役割を果たしていると考えられる。

(2) 妊娠糖尿病モデルラット胎盤におけるアデノシントランスポーターの発現制御：

糖尿病モデルラット胎盤における ENT1、ENT2、ENT3 (Slc29a3) および CNT3 (Slc28a3) の mRNA 発現量は、正常ラット胎盤と同程度であった。一方、CNT2 (Slc28a2) mRNA 発現量は、正常と比べ妊娠糖尿病ラットの胎盤において有意に増加していた。胎盤 BBMV によるアデノシン取り込みにおける Na⁺感受性は、正常胎盤と比較して糖尿病モデルでは 2 倍以上に増大した。CNT2 は Na⁺依存的にアデノシンを輸送することから、Na⁺感受性の増大は CNT2 を介した輸送活性の上昇を反映していると考えられる。以上より、糖尿病発症時の胎盤において CNT2 の発現が誘導されることが示唆された。このことは、母体血中からアデノシンをより能動的に取り込もうとした結果であると考えられ、胎児血管内皮細胞のアデノシン受容体への作用を増強することにより、胎盤胎児血管の収縮つまり子宮内胎児発育不全に関与している可能性がある。

(3) 妊娠低栄養モデルラット胎盤における遺伝子発現および栄養物質濃度変動：

ATP 貯蔵物質として働くクレアチン合成には、合成酵素の発現および前駆体アルギニンの細胞内供給が重要であるとされている。DNA マイクロアレイおよびリアルタイム定量 PCR 法を用いた解析の結果、カロリー制限群胎盤において、クレアチン合成酵素 L-arginine, glycine amidinotransferase

(Agat) およびクレアチン前駆体であるアルギニンのトランスポーター、Cat2 (Slc7a2) の発現が増加していた。一方、アルギニン代謝経路中に含まれる酵素 arginase (Arg) および ornithine carbamoyltransferase (Otc) の発現減少が示された。したがって、カロリー制限群の胎盤においてクレアチン合成促進への遺伝子発現変動が生じていると考えられ、栄養供給が不足した状況下において必要なエネルギーを保持する代償性変化として位置づけられる。ただし、母体血漿中クレアチン濃度はカロリー制限群で著しく上昇している一方、胎児血漿中・胎盤内クレアチン濃度に変動は示されなかった。母体血漿中クレアチン濃度が上昇していることから低栄養環境においてクレアチン合成・代謝系は大きく変化していると考えられるが、今後は胎盤クレアチン濃度の決定因子の解明を進めていくことが重要である。

カロリー制限群胎盤において、レプチン発現量の減少、レプチン受容体発現量の増加が示された。レプチンは妊娠時に胎盤でも分泌され、エネルギー代謝調節や胎盤内分泌制御を介して胎児成長や分娩時のエネルギー供給に関与している。子宮内発育遅延胎児においては出生時に低値だったレプチンが出生後は対照群よりも高値を示し、レプチン分泌異常が成長後のレプチン抵抗性や肥満と関連している可能性が示されている。レプチンおよびレプチン受容体の発現量変化は低栄養によって崩れたエネルギー代謝バランスを改善させるために生じた変化である可能性があり、さらに解析を進める必要がある。

これら研究成果は、血液胎盤関門が母体栄養環境や胎盤分化過程に対応して胎児環境維持に向けたトランスポーター等の発現制御を受けることを具体的に示しており、胎児成長における胎盤の役割、および胎盤関門による薬物の胎児移行制御機構を理解する上で重要な知見である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- (1) T. Nishimura, Y. Sai, J. Fujii, M. Muta, H. Iizasa, M. Tomi, M. Deureh, N. Kose, E. Nakashima: Roles of TauT and system A in cytoprotection of rat syncytiotrophoblast cell line exposed to hypertonic stress, *Placenta*, 31, 1003-1009 (2010). [査読有]
- (2) Y. Sai, T. Nishimura, K. Ochi, N. Tanaka, A. Takagi, M. Tomi, N. Kose, Y. Kobayashi, N. Miyakoshi, S. Kitagaki, C. Mukai, E. Nakashima: Proton-coupled erythromycin antiport

at rat blood-placenta barrier, *Drug Metab. Dispos.*, 38, 1576-1581 (2010). [査読有]

- (3) M. Tomi, K. Hosoya: The role of blood-ocular barrier transporters in retinal drug disposition: an overview, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, 6, 1111-1124 (2010). [査読有]
- (4) M. Tachikawa, Y. Takeda, M. Tomi, K. Hosoya: Involvement of OCTN2 in the transport of acetyl-Lcarnitine across the inner blood-retinal barrier, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 51, 430-436 (2010). [査読有]
- (5) M. Tomi, N. Kitade, S. Hirose, N. Yokota, S. Akanuma, M. Tachikawa, K. Hosoya: Cationic amino acid transporter 1 (CAT1)-mediated L-arginine transport at the inner blood-retinal barrier, *J. Neurochem.*, 111, 716-725 (2009). [査読有]

[学会発表] (計8件)

- (1) 関口万智子, 西村友宏, 登美斉俊, 中島恵美: 妊娠期低栄養が胎盤遺伝子発現に与える影響の解析, *日本薬学会第131年会*, 2011年3月29日, 静岡.
- (2) M. Tomi, Y. Miyata, T. Nishimura, E. Nakashima: Up-regulation of organic anion transporter 4 (OAT4) by forskolin-induced differentiation in JEG-3 cells, *Pharmaceutical Sciences World Congress 2010*, Nov 16th, 2010, New Orleans.
- (3) M. Tomi, T. Chishu, N. Kose, T. Nishimura, E. Nakashima: Regulation of nucleoside transporters in the placenta of experimental diabetes, *日本薬物動態学会第25年会*, 2010年10月8日, さいたま.
- (4) 登美斉俊: 血液組織関門トランスポーターの発現と制御, *第54回日本薬学会関東支部大会*, 2010年10月2日, 東京.
- (5) 西村友宏, 地主拓也, 登美斉俊, 巨勢典子, 中島恵美: 妊娠糖尿病モデルラット胎盤における核酸トランスポーターの発現変動, *第5回トランスポーター研究会年会*, 2010年7月10日, 東京.
- (6) 登美斉俊, 宮田優希, 巨勢典子, 西村友宏, 中島恵美: ヒト血液胎盤関門 organic anion transporter 4 発現における cAMP/Protein kinase A 経路の関与, *第5回トランスポーター研究会年会*, 2010年7月10日, 東京.
- (7) 登美斉俊, 宮田優希, 西村友宏, 中島恵美: ヒト血液胎盤関門の分化過程における OAT4 発現誘導, *日本薬剤学会第25*

年会, 2010年5月12日, 徳島.

- (8) 宮田優希, 登美斉俊, 西村友宏, 中島恵美: ヒト血液胎盤関門モデル細胞株における有機アニオントランスポーター (OAT4) の forskolin による発現誘導, *日本薬学会第130年会*, 2010年3月28日, 岡山.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

登美 斉俊 (TOMI MASATOSHI)
慶應義塾大学・薬学部・講師
研究者番号: 30334717

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし