

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：34414

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590207

研究課題名(和文) 至適分化させたヒト絨毛癌細胞株 JEG-3 層による包括的胎盤薬物透過指標の確立

研究課題名(英文) In vitro approaches to evaluate placental drug transport by using differentiating JEG-3 human choriocarcinoma cells

研究代表者

池田 賢二 (IKEDA, Kenji)

大阪大谷大学・薬学部・講師

研究者番号：10434812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)：本課題では、妊娠時薬物療法における胎児安全性の情報蓄積の一環として、より簡便かつ、より生体内を反映した包括的胎盤薬物透過評価モデルを確立することに取り組んだ。医薬品の胎盤透過を評価するためには、モデル細胞層が胎盤の物質透過を主に担う層であるシンシチオトロホプラスト層に類似している必要がある。まず、ヒト絨毛癌細胞株から分化させた JEG-3 細胞層(DJEG)が、生体内とよく類似しており、現状では最適なモデル細胞層であることを見いだした。以後、各種医薬品の胎児移行性を評価するとともに、さらに生体内類似性を高めることで、本モデルが医薬品の胎児移行を評価する指標となり得ることを明確にしていく。

研究成果の概要(英文)：Human choriocarcinoma cells have been used as models for studying transcellular drug transport through placental trophoblasts. However, these models allow the transport of low-molecular-weight drugs through intercellular gap junctions. This study aimed to investigate the differentiation patterns of JEG-3 choriocarcinoma cells under different culture conditions and establish the appropriate model of in vitro syncytiotrophoblast drug transport. The differentiation pattern of JEG-3 cultured in CS-C resembled the syncytiotrophoblast-like differentiation signal characterizations in vivo. In conclusion, the syncytiotrophoblast-like models of differentiating JEG-3 cells cultured in CS-C might be appropriate for evaluating drug transport across the placental trophoblast.

研究分野：医療薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：胎盤 モデル 物質透過 トロホプラスト BCRP DJEG JEG-3 妊娠時薬物療法

1. 研究開始当初の背景

妊娠時の薬物療法は、臨床研究の困難さなどの理由から、他に比べて安全性のエビデンスが十分に確立されていない現状がある。そのため、妊娠時の薬物療法においては、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

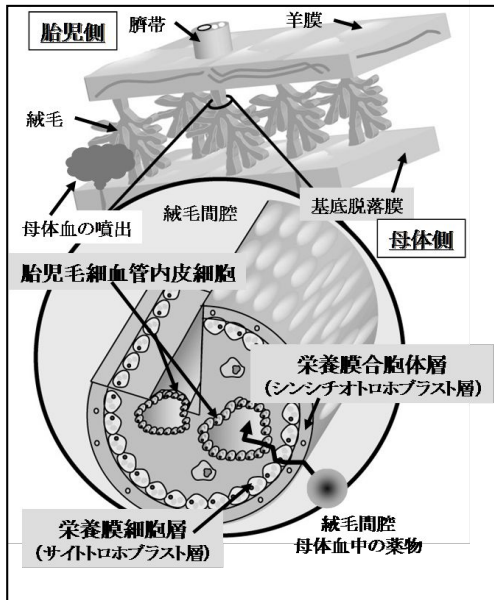


図1 満期胎盤および絨毛模式図

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、主にトロホプラスト細胞層であると考えられる。トロホプラスト細胞層の中でも、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へと形態変化を遂げる。このシンシチオトロホプラスト層を反映した、実験的モデル(*in vitro* モデル)を作製する事ができれば、医薬品の胎児移行性の基準となり得る指標を得る事ができ、大きく胎児安全性情報の蓄積に寄与できる。

2. 研究の目的

本課題研究代表者らは、胎児安全性の初期段階である胎盤薬物透過性に焦点を絞り、まずより簡便かつ、より生体内(*in vivo*)を反映した *in vitro* 包括的胎盤薬物透過評価モデルを確立することを第1の目的とした。胎盤薬物透過指標を確立することは、本邦における妊娠時薬物療法安全性のエビデンスの一環として極めて有用である。第2段階では臨床現場の協力を得て、可能な限り近未来に有益な医薬品を選択し包括的評価を行えるよう考慮する。適切な同種薬物透過性を比較検討することで、添付文書記載への提案も視野に入れ、本モデルを胎盤薬物透過指標として

確立することを最終目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト絨毛由来 JEG-3 細胞株 (Lot no. 04E018, DS ファーマバイオメディカル)は、10% fetal bovine serum (FBS)を含有した Eagle's minimum essential medium (MEM, ナカライテスク)を用いて、5% CO₂、37°C 条件下により維持培養した。ポアサイズ 0.4 μm、膜面積 0.7 cm² の Polyethylene terephthalate (PET)メンブレンを有する 24 ウェルのセルカルチャーインサート、ミリセル®(ミリポア)の培養膜を、コラーゲン Type 1 (新田ゼラチン):60% エタノール(1:3)の 50 μL でコーティングし、無菌的に一夜静置乾燥後、これに 50,000 個/cm²の細胞密度で播種した。ミリセル®上で培養後、それぞれの細胞層を 10 日間経日的に TEER 値の測定を行った。TEER 値の測定には、ミリセル®ERS 装置(ミリポア)を用いた。

(2) 各種培養液により JEG-3 細胞を培養後、RNeasy protect cell mini kit (Qiagen)を用いて total RNA を抽出し、その 1 μg から iScript® cDNA synthesis kit (Bio-Rad)により first strand cDNA 鋳型を得た。この cDNA を RT-PCR の鋳型として、分化指標として hPL、NECC1、BCRP、MDR1、MRPs、OCLN、ZO-1、CLDN1、およびハウスキーピングジーンとして -actin (ACTB) のプライマーにより、multiplex PCR assay kit を用いて RT-PCR を行った。PCR には、GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)を用いた。PCR 産物の電気泳動は、2% アガロースゲルを用い、エチジウムブロマイドで染色後、UV ライトを照射して観察した。Multiplex RT-PCR 法によって発現誘導が認められた mRNA に関しては、TaqMan® gene expression assays (ABI)を用いて、各種培養液により培養した JEG-3 の mRNA 発現レベルを定量した。TaqMan® gene expression assays は、hPL、BCRP、NECC1、および CLDN1 をターゲットとした kit を使用した。ACTB (encoded by the ACTB gene、TaqMan® human endogenous control)をハウスキーピングジーンとし、multiplex RT-PCR 法と同様に作製した cDNA 鋳型を用いて real-time PCR detector (Opticon®2; Bio-Rad)により増幅定量を行った。

(3) MEM による培養 3 日間の NJEG 細胞 (M3 細胞)、7 日間の NJEG 細胞、および後半 4 日間を CSC®培地で培養した DJEG 細胞を PBS で洗浄し、M-PER®100 μL で 30 分間溶解して蛋白溶解液を得た。蛋白溶解液を、10,000 g で 20 分間遠心し、その上清を BCA kit (Pierce)で蛋白定量を行い、ウエスタンブロッティングに用いた。1 レーンの蛋白量は 20 μg で電気泳動を行い、PVDF メンブレンに転写し、1 次抗体 Mouse monoclonal antibodies directed against human BCRP (Calbiochem)、

Mouse monoclonal antibody (BXP-21) directed against human ECAD (R&D)、および Mouse monoclonal antibody (A1978) directed against human ACTB (Sigma)を用いて ECL plus(GE Healthcare)による発光検出を行った。

4. 研究成果

(1) これまでの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、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、細胞間隙透過の影響のために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。胎盤薬物透過評価モデルには、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も表現し得るモデルが必要であり、経上皮電気抵抗値 (TEER) 上昇を伴うバリア能を高めた膜の構築が必要不可欠である。ここで、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る。まず、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、至適分化させた JEG-3 層 (DJEGs) が TEER の上昇を伴った、妥当なバリア能を表現し得ることを明かとした (図 2)。

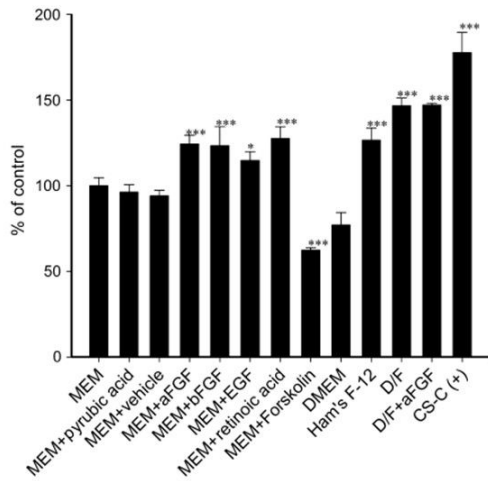
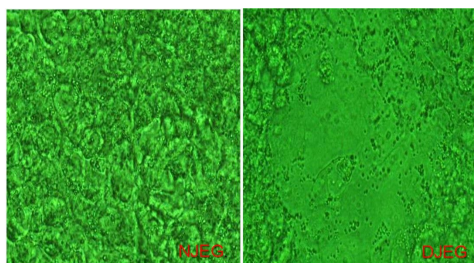


図2 JEG-3細胞層の各種培養条件によるTEER比較

(2) DJEGs は細胞間隙透過と逆相関する TEER 値の上昇を最も良く示したが、次に *in vivo* 類似性を検証する必要がある。ここで、DJEGs がシンシチオトロホプラスト様の細胞融合能を獲得している可能性が見いだされ



Phase-contrast microscopy (× 200) of JEG-3 cells on plastic plates.
図3 DJEGsの細胞融合能獲得

た (図 3)。

(3) さらに、シンシチオトロホプラスト様分化指標の mRNA 発現を確認することで、CS-C®培地によって培養した JEG-3 細胞層 (DJEGs) が、シンシチオトロホプラストと類似していることが示され (表 1) 胎盤関門モデルとして現状では最適な細胞層であることを明かとした。

表 1 DJEGs の既報シンシチオトロホプラストとの類似性

Characterizations	Syncytiotrophoblasts (as reported previously)	NJEGs in our study	DJEGs in our study
Expression of BCRP	Induced	Mildly induced	Induced
Expression of MDR1	Reduced	Not detected	Not detected
Expression of E-cadherin	Reduced	Strongly induced	Reduced
Expression of cadherin-11	Induced	Not detected	Mildly induced
Fusion ability	Fusogenic	Non-fusogenic	Mildly fusogenic
Expression of NECC1	Temporarily induced	Not detected	Induced

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

池田 賢二、山崎 恭平、保米本 愛美、山上 聡子、小川 雅史、中尾 絵莉奈、福永 悠海、中西 剛、宇都口 直樹、名徳 倫明、廣谷 芳彦、Efflux transporter mRNA

expression profiles in differentiating JEG-3 human choriocarcinoma cells as a placental transport model., Pharmazie, 査読有、67 巻、2012、88-90、doi : 10.1691/ph.2012.1593

池田 賢二、宇都口 直樹、筒居 秀伸、山上 聡子、保米本 愛美、中尾 絵莉奈、福永 悠海、山崎 恭平、名徳 倫明、廣谷 芳彦、*In Vitro Approaches to Evaluate Placental Drug Transport by Using Differentiating JEG-3 Human Choriocarcinoma Cells.*、Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.、査読有、108 巻、2011、138-145

[学会発表](計9件)

池田 賢二、Effect of Breast Cancer Resistance Protein on Cimetidine Transport across the Placental model using Differentiating Human Choriocarcinoma JEG-3 Cells、13th International Congress of Therapeutic Drug Monitoring & Clinical Toxicology (IATDMCT)、2013 年 9 月 26 日、Grand America Hotel, Salt Lake City, USA

小宮山 水智、池田 賢二 他、ヒト由来がん細胞株の増殖率に及ぼす各種培養条件の影響、第 22 回日本医療薬学会年会、2012 年 10 月 28 日、新潟 朱鷺メッセ 寺尾 佳子、池田 賢二 他、新規 in vitro 胎盤薬物透過評価モデルにおける物質透過機能解析、第 62 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2012 年 10 月 20 日、武庫川女子大学・薬学部

池田 賢二、医薬品の胎児移行性評価に適う細胞層モデルの検討、日本薬学会第 132 年会シンポジウム(妊娠時薬物療法に関わる基礎と臨床の情報共有機会拡大に関する提言)、2012 年 3 月 31 日、北海道大学

福永 悠海、池田 賢二 他、医薬品医療機器総合機構発出医薬品情報の周知方法に関する検討、第 21 回日本医療薬学会年会、2011 年 10 月 1 日、神戸国際会議場 山崎 恭平、池田 賢二 他、分化 JEG-3 細胞株による *In vitro* 胎盤薬物透過評価モデルを用いた SSRI および睡眠剤の栄養膜透過に関する検討、第 21 回日本医療薬学会年会、2011 年 10 月 1 日、神戸国際会議場

保米本 愛美、池田 賢二 他、ヒト絨毛癌細胞株 BeWo と JEG-3 の Breast Cancer Resistance Protein 遺伝子多型判定について、第 21 回日本医療薬学会年会、2011 年 10 月 1 日、神戸国際会議場

中尾 絵莉奈、池田 賢二 他、分化させたヒト絨毛癌細胞株 JEG-3 の Multidrug associated protein 発現誘導の比較検討、第 21 回日本医療薬学会年会、2011 年 10

月 1 日、神戸国際会議場 山上 聡子、池田 賢二 他、ヒト絨毛癌細胞株 JEG-3 及び BeWo 細胞層の胎盤薬物透過モデルにおける有用性の比較、第 21 回日本医療薬学会年会、2011 年 10 月 1 日、神戸国際会議場

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・講師
研究者番号：10434812

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

宇都口 直樹 (UTOGUCHI, Naoki)
帝京大学・薬学部・教授
研究者番号：80276633

廣谷 芳彦 (HIROTANI, Yoshihiko)
大阪大谷大学・薬学部・教授
研究者番号：00351487

名徳 倫明 (MYOTOKU, Michiaki)
大阪大谷大学・薬学部・准教授
研究者番号：30469233