

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790199

研究課題名（和文）胎盤内分泌機能と協調する薬物の胎盤関門透過性制御の分子基盤

研究課題名（英文）Molecular basis of mechanisms underlying transplacental drug transfer in corporation with placental endocrine function

研究代表者

登美 斉俊 (TOMI MASATOSHI)

慶應義塾大学・薬学部・准教授

研究者番号：30334717

研究成果の概要（和文）：ヒト胎盤関門側底膜には organic anion transporter (OAT) 4 を介してエストリオール(E3)前駆体 16 $\alpha$ -hydroxy dehydroepiandrosterone sulfate を胎児から取り込む機構が存在し、本機構は妊娠期 E3 合成量の決定因子の一つであることが示唆された。さらに、OAT4 の発現には、関門への分化過程における PKA シグナルを介した発現誘導機構が関与することを示唆する知見を得た。以上の結果から、胎盤内分泌機能においてトランスポーターによる胎盤透過性制御が重要な役割を果たすことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Organic anion transporter (OAT) 4 expressed at the basolateral membrane of the placental barrier appears to play a principal role in the uptake of 16 $\alpha$ -OH DHEAS and contribute to the E3 synthesis during pregnancy. Moreover, the expression of OAT4 in JEG-3 human choriocarcinoma cells was upregulated by the activation of the PKA signal transduction pathway. These results suggest that transporters at the placental barrier play an important role in placental endocrine functions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：胎盤関門、内分泌、トランスポーター

## 1. 研究開始当初の背景

薬物胎児移行性を規定する胎盤関門は栄養膜細胞が分化融合した合胞体性栄養膜細胞によって形成される。従って、胎盤関門透過性の個体内・個体間変動は合胞体性栄養膜細胞層において経細胞輸送を制御する輸送担体、受容体の機能発現によって規定される。妊婦への薬剤投与時において、これら胎盤関門透過規定分子の発現量情報を得ることは、胎盤関門透過性を高精度に個別化予測するカギとなる。申請者は、胎盤関門を形成する合胞体性栄養膜細胞が内分泌細胞として、絨毛性ゴナドトロピン(hCG)、胎盤性ラクログ

ン(hPL)、胎盤性エストリオール(E3)をはじめとする妊娠期特有の内分泌においても主要な役割を果たすことに着目した。胎盤内分泌機能は未分化栄養膜細胞が分化融合する過程で成熟し、PKA-CREB 経路や MAPK 経路などのシグナル伝達が主たる役割を果たす。これら内分泌機能成熟シグナルは、同様に未分化栄養膜細胞が分化融合する過程で成立する胎盤関門においても主要な役割を果たしている可能性がある。関門・内分泌機能の協調的制御機構の解明は、胎盤由来内分泌物質の分泌量を指標として胎盤関門透過規定分子の発現量を個別化予測する上で重

要な分子基盤となる。

Organic anion transporter (OAT) 4 (SLC22A11)は、その発現が霊長類の胎盤と腎にほぼ限定された種および臓器特異性の高いトランスポーターであり、胎盤関門の側底膜に局在する。霊長類において、エストリオール(E3)は妊娠時における主要なエストロゲンであり、ヒト妊娠末期の尿中 E3 値は非妊娠時の数百倍にも達する。妊娠時 E3 は合胞体性栄養膜細胞層で合成され、前駆体である 16 $\alpha$ -hydroxy dehydroepiandrosterone sulfate (16 $\alpha$ -OH DHEAS)の90%は胎児由来である。そのため、胎盤関門の胎児側である側底膜に発現する OAT4 は、16 $\alpha$ -OH DHEAS 取り込みを担うトランスポーターとして妊娠期 E3 合成に不可欠な役割を果たしている可能性がある。しかし、16 $\alpha$ -OH DHEAS の輸送機構に関しては、その放射標識体の入手が困難であったことなどから、全く解析されていなかった。胎盤における E3 合成酵素である sulfatase 欠損を胎児が有する場合、母体 E3 濃度低下を示し、陣痛発来遅延および経管成熟不全により帝王切開を行うことが多い。16 $\alpha$ -OH DHEAS 輸送機構を解明することは、胎盤トランスポーターの E3 合成における生理的役割を明らかにし、母体 E3 濃度低下の潜在的な原因を見出す上でも重要である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、胎盤関門における輸送担体の発現が分化融合過程における内分泌物質の分泌機能成熟との協調的シグナル制御を受けることを明らかにすることである。具体的には、内分泌機能成熟シグナル PKA が OAT4 の機能発現に与える影響を明らかにし、さらに胎盤関門側底膜における OAT4 の発現が 16 $\alpha$ -OH DHEAS 輸送および E3 合成に果たす役割を胎盤関門のモデル細胞系および OAT4 強制発現細胞を用いて解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

未分化栄養膜細胞モデルであるヒト絨毛癌由来 JEG-3 細胞を、PKA 活性化剤である 100  $\mu$ M forskolin を用いて処理することで分化誘導した。細胞から total RNA を抽出し、cDNA を合成した後、輸送担体の mRNA 発現量を real-time PCR 法で相対定量した。同様に培養した細胞に [ $^3$ H]estrone sulfate (E $_1$ S)、[ $^3$ H]DHEAS、あるいは [ $^3$ H]16 $\alpha$ -OH DHEAS を含む緩衝液を添加し、37 $^{\circ}$ C で一定時間インキュベートした後、細胞内標識基質を液体シンチレーションカウンターで測定することで輸送活性を解析した。なお、[ $^3$ H]DHEAS をヒト CYP3A7 のバキュロウイルス発現系マイクロソームと反応させること

で [ $^3$ H]16 $\alpha$ -OH DHEAS へと酵素的に変換した。16 $\alpha$ -OH DHEAS と DHEAS は HPLC を用いて流速 1 mL/min の条件で分離し、10 秒間隔で分取を行った。16 $\alpha$ -OH DHEAS および DHEAS の保持時間は非標識体の標品を用い、波長 193 nm での吸収で確認した。ヒト OAT4、OATP2B1 発現プラスミドをリポフェクション法により COS-7 細胞に導入して一過性に発現させ、[ $^3$ H]16 $\alpha$ -OH DHEAS 輸送を解析した。JEG-3 細胞からの E3 分泌は ELISA により定量した。

## 4. 研究成果

Forskolin 添加培地で複数のヒト栄養膜細胞株を 72 時間培養したところ、JEG-3 細胞において非添加時に比べ合胞体性栄養膜細胞マーカーである  $\beta$ -hCG 産生量および syncytin 1 mRNA 発現量は顕著に増加した。他の細胞株では、JEG-3 細胞で示された顕著な上昇は示されなかった。以上の結果より、JEG-3 細胞は forskolin により合胞体性栄養膜細胞様細胞へと分化することが示唆されたため、以後の解析において JEG-3 細胞を用いることにした。

分化促進による OAT4 発現機構への影響を評価するために、OAT4 mRNA 発現量を定量した。Forskolin 添加培地で培養した JEG-3 細胞において OAT4 mRNA 発現量は非添加時と比べ 4.3 倍に増加した。さらに、分化促進による OAT4 を介した輸送活性への影響を評価するため、OAT4 の基質である [ $^3$ H]DHEAS および [ $^3$ H]E $_1$ S を用いて JEG-3 細胞への取り込みを測定した。その結果、forskolin 添加培地で培養した JEG-3 細胞において非添加時に比べ有意に両基質の取り込み活性が上昇した。また、非標識 1 mM DHEAS および E $_1$ S 存在下では両基質の取り込みが阻害された。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 (5  $\mu$ M)との併用によって減弱した。以上から、forskolin による PKA 活性化が JEG-3 細胞における OAT4 の機能発現を誘導することが示唆された。

Forskolin が他の有機アニオントランスポーターの発現に与える影響を検討した。ヒト胎盤関門において、OAT4 に加えて organic anion transporting polypeptide 2B1 (OATP2B1)および organic solute carrier protein 1 (OSCP1)の発現が報告されている。また、sodium-dependent organic anion transporter (SOAT)は胎盤において高い mRNA 発現が報告されている。しかし、JEG-3 細胞において OATP2B1 と SOAT の発現は検出されず、OSCP1 mRNA 発現量は forskolin 添加による影響を受けないことが示された。よって、forskolin による JEG-3 細胞における [ $^3$ H]DHEAS および [ $^3$ H]E $_1$ S 取

り込み活性の上昇は、OAT4 の発現量増加によることがさらに強く示唆された。

分化誘導を受けた JEG-3 細胞における<sup>[3H]</sup>16 $\alpha$ -OH DHEAS の取り込みは時間依存的であり、2 分で定常状態に達した。<sup>[3H]</sup>16 $\alpha$ -OH DHEAS 取り込みは 1 mM 非標識 DHEAS により有意に阻害されたことから、トランスポーターを介した輸送であることが示唆された。さらに、OAT4 阻害剤である DHEAS、E<sub>1</sub>S、bromosulfophthalein (BSP)、probenecid、および 1 mM では OAT4 を阻害しない tetraethylammonium (TEA)、cimetidine、*p*-aminohippuric acid (PAH) を各々 1 mM 添加した条件下で<sup>[3H]</sup>16 $\alpha$ -OH DHEAS の取り込みを解析した。その結果<sup>[3H]</sup>16 $\alpha$ -OH DHEAS の取り込みは、DHEAS、E<sub>1</sub>S および BSP の存在下で有意な減少が示され、probenecid の存在下でも減少傾向が示された。一方、TEA、cimetidine および PAH では阻害されなかった。したがって、JEG-3 細胞における<sup>[3H]</sup>16 $\alpha$ -OH DHEAS 取り込みには OAT4 の関与が示唆された。一方、OSCP1 については、その主たる基質である PAH による阻害が示されず、関与は少ないことが示唆された。

分化誘導を受けた JEG-3 細胞において、エストロゲン前駆体非添加時には E2 および E3 がほとんど分泌されなかったのに対し、DHEAS 添加培養時には E2、16 $\alpha$ -OH DHEAS 添加培養時には E3 の選択的な分泌が検出された。これら前駆体選択的な E2 および E3 分泌はともに 50  $\mu$ M BSP 共存培養下において、30%以上有意に阻害された。この結果から、BSP によって前駆体の OAT4 取り込み段階が阻害されることでエストロゲン分泌が減少することが示唆された。

ヒト OAT4 を一過性に発現させた COS-7 細胞における<sup>[3H]</sup>16 $\alpha$ -OH DHEAS 取り込みは mock 細胞と比較して有意に高く、その K<sub>m</sub> 値は 7.4  $\mu$ M であった。OAT4 発現 COS-7 細胞における<sup>[3H]</sup>16 $\alpha$ -OH DHEAS の取り込みは 1 mM DHEAS、E<sub>1</sub>S、BSP、および probenecid の存在下で有意に低下したが、1 mM TEA では阻害されず、JEG-3 細胞における<sup>[3H]</sup>16 $\alpha$ -OH DHEAS 取り込みの性質と一致した。一方、ヒト OATP2B1 一過性発現 COS-7 細胞においては、OATP2B1 を介した<sup>[3H]</sup>16 $\alpha$ -OH DHEAS 取り込み活性は検出されなかった。

結論として、胎盤関門における OAT4 の発現には、合胞体性栄養膜細胞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。さらに、ヒト胎盤関門側底膜において、OAT4 による胎児中 16 $\alpha$ -OH DHEAS の細胞内取り込み機構の存在が示唆された。OAT4 を介した胎児側からの 16 $\alpha$ -OH DHEAS 取り込み機構は妊娠期

E3 合成において重要な生理的役割を果たしていると考えられる。胎盤内分泌機能においてトランスポーターによる胎盤透過性制御が重要な役割を果たすことが明らかとなった。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

(1) Oda K, Nishimura T, Higuchi K, Ishido N, Ochi K, Iizasa H, Sai Y, Tomi M, Nakashima E. Estrogen receptor  $\alpha$  induction by mitoxantrone increases Abcg2 expression in placental trophoblast cells. J Pharm Sci. 査読有 102, 2013, 印刷中. DOI: 10.1002/jps.23549

(2) Nishimura T, Chishu T, Tomi M, Nakamura R, Sato K, Kose N, Sai Y, Nakashima E. Mechanism of nucleoside uptake in rat placenta and induction of placental CNT2 in experimental diabetes. Drug Metab Pharmacokinet. 査読有 27(4), 2012, 439-446. DOI: 10.2133/dmpk.DMPK-11-RG-103

(3) Hosoya K, Tomi M, Tachikawa M. Strategies for therapy of retinal diseases using systemic drug delivery: relevance of transporters at the blood-retinal barrier. Expert Opin Drug Deliv. 査読有 8(12), 2011, 1571-1587. DOI: 10.1517/17425247.2011.628983

(4) Tomi M, Nishimura T, Nakashima E. Mother-to-fetus transfer of antiviral drugs and the involvement of transporters at the placental barrier. J Pharm Sci. 査読有 100(9), 2011, 3708-3718. DOI: 10.1002/jps.22642

(5) Nishimura T, Tanaka J, Tomi M, Seki Y, Kose N, Sai Y, Nakashima E. Enhancement of zidovudine transfer to molt-4 cells, a human t-cell model, by dehydroepiandrosterone sulfate. J Pharm Sci. 査読有 100(9), 2011, 3959-3967. DOI: 10.1002/jps.22624

[学会発表] (計 9 件)

(1) 登美 斎 俊、西村 友 宏、中島 恵 美. 医薬品の胎盤透過制御機構とその in vitro 評価. 日本動物実験代替法学会第 25 回大会, 2012 年 12 月 8 日, 東京.

(2) Tomi M. Role of anion transporters, IN: Workshop 11 "The role of human placenta in regulating fetal exposure

to medications during pregnancy. IFPA Meeting 2013, 2012年9月21日, 広島.

(3) Tomi M., Ozaki M, Nishimura S, Higuchi K, Nishimura T, Nakashima E. Role of organic anion transporter (OAT) 4 on estriol synthesis in the placental syncytiotrophoblasts. IFPA Meeting 2013, 2012年9月18日, 広島.

(4) 西村祥香, 西村友宏, 樋口慧, 登美齐俊, 中島恵美. 胎盤エストロゲン合成における organic anion transporter (OAT) 4 の役割. 日本薬学会第132年会, 2012年3月31日, 札幌.

(5) Tomi M., Ozaki M, Nishimura S, Higuchi K, Nishimura T, Nakashima E. Role of OAT4 for supplying estriol precursor, 16 $\alpha$ -hydroxy dehydroepiandrosterone sulfate, into the human placenta. International Symposium on Past, Present and Future of Molecular Pharmacokinetics, 2012年1月17日, 東京.

(6) Tomi M., Ozaki M, Higuchi K, Nishimura T, Nakashima E. OAT4/SLC22A11-mediated uptake of 16 $\alpha$ -hydroxydehydroepiandrosterone sulfate at the placental barrier. Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2011, 2011年12月11日, Kuala Lumpur, Malaysia.

(7) 登美齐俊, 尾崎真由子, 宮田優希, 西村祥香, 樋口慧, 西村友宏, 中島恵美. 胎盤関門における OAT4 の生理的役割とその発現制御. 第33回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2011年11月25日, 岡山.

(8) 登美齐俊, 尾崎真由子, 西村友宏, 中島恵美. OAT4 を介したエストリオール前駆体 16 $\alpha$ -OH DHEAS 輸送機構とその役割. 第6回トランスポーター研究会年会, 2011年6月11日, 仙台.

(9) 登美齐俊, 尾崎真由子, 西村友宏, 中島恵美. 胎盤関門 OAT4 を介したエストリオール前駆体 16 $\alpha$ -OH DHEAS 輸送機構. 日本薬剤学会第26年会, 2011年5月31日, 東京.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

登美 齐俊 (TOMI MASATOSHI)

慶應義塾大学・薬学部・准教授

研究者番号：30334717

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし