

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 5 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：23790606

研究課題名（和文） エズリンによる胎盤機能維持分子機構と胎児発育不全予防の新戦略

研究課題名（英文） Molecular mechanism for sustention of placental function by ezrin and a new approach to prevention of fetal growth retardation

研究代表者 巨勢 典子 (KOSE NORIKO)

慶應義塾大学・薬学部・研究員

研究者番号：60348612

研究成果の概要（和文）：

胎児発育不全を示すエズリン欠損で呈される胎児胎盤中ヒポタウリン欠乏の原因を解析した。胎盤においてヒポタウリンは主に細胞膜輸送により濃度維持され、その分子実体としてエズリンと相互作用する Slc6a13 の関与が示唆された。Slc6a13 のヒポタウリン取込み輸送の親和性は血中濃度と同程度であった。母体への過剰なヒポタウリン投与は胎児胎盤のヒポタウリン濃度増加に寄与が少なく、代替法の必要性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed the mechanisms of hypotaurine deficiency in the placenta of ezrin (Vil2) gene knockout mouse which shows fetal growth retardation. The results indicate that hypotaurine concentration in the placenta is mainly supplied by membrane transport from outside via uptake transporters such as Slc6a13. The uptake affinity of hypotaurine by Slc6a13 was similar to the plasma concentration. Continuous dosing of hypotaurine in pregnant mouse did not increase that in fetus probably due to saturation of transporter at the placenta. An alternative approach to ameliorate the hypotaurine deficiency in fetus will be needed.

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：薬物動態学・生物薬剤学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：薬物代謝酵素・トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

胎盤の合胞体栄養芽細胞は、妊娠中期に成熟し母児間の物質移行を司る「多核化した構造関門」を形成する極めて特異な細胞である。胎盤機能の維持は胎児の発育に重要であるが、『合胞体栄養芽細胞の輸送担体発現制御が胎児発育不全に及ぼす影響』は殆ど研究されてこなかった。我々はその細胞内シグナル伝達とトランスポートソームに着目し、胎盤機能の維持機構を解明してきた。これまでに

申請者は、細胞膜タンパク質と相互作用する ezrin が、妊娠中期特異的に胎盤に発現し、胎児胎盤系において成長に不可欠な因子となっていることを見出した。影響を代謝物一斉分析により ezrin の欠損は胎児胎盤系においてヒポタウリンの欠乏を惹起することを見出した。またヒポタウリンを輸送するトランスポーターとして新規に Slc6a13 が関与する可能性が推察された。

2. 研究の目的

Ezrinの機能不全は胎盤関門における一部のトランスポーター機能不全を惹起し、胎盤のヒポタウリン輸送機能不全に陥ることが、胎盤障害および胎児発育不全に繋がると推測した。しかし、胎盤においてヒポタウリンの輸送機能は全くの未解明であり、またヒポタウリンを輸送するトランスポーターに関しても全く報告がなかった。そこで本研究の目的は『妊娠中期においてezrinが胎盤の栄養物輸送体の細胞膜発現を調節し、胎児成長を制御する』との仮説を証明することとした。具体的には以下の項目を解明し、エズリンノックアウトマウス胎盤における胎盤機能不全の発症機構と胎児発育不全の回避方法を見出すこととした。

- (1) ヒポタウリンの合胞体栄養芽細胞での濃度維持に取込み輸送に主に関与すること、またその輸送分子としてSlc6a13が関与すること
- (2) エズリンがSlc6a13のヒポタウリン輸送機能を促進すること
- (3) Slc6a13が合胞体栄養芽細胞における局在を明らかにすること
- (4) ヒポタウリン補充療法による胎児胎盤中ヒポタウリン濃度の評価と胎児発育不全の改善方法の探索

3. 研究の方法

絨毛性栄養膜細胞におけるヒポタウリンの濃度維持機構を解明するため、血液胎盤関門モデル細胞株 TR-TBT18d-1細胞を用い、ヒポタウリンの細胞内濃度を LC/MS/MS にて測定した。培養に用いる仔ウシ血清を透析することにより、ヒポタウリン非含有細胞培養液を調製し、TR-TBT18d-1細胞内のヒポタウリン濃度変化を解析した。

エズリンによるSlc6a13の機能変動を解析するためエズリンおよびSlc6a13の共発現系をHEK293細胞により作成し、Slc6a13機能に及ぼすエズリンの影響を測定した。Slc6a13遺伝子およびエズリン遺伝子 *Vi12* を一過性にHEK293細胞に導入し、Slc6a13の機能として[3H]GABA輸送能を評価した。Slc6a13による[3H]GABA輸送速度をMichaelis-Menten型回帰式にて解析した。

胎盤におけるSlc6a13の機能を明らかにするため、免疫染色法によりSlc6a13の局在を解析した。同時に、絨毛性栄養膜細胞マーカー

一、絨毛性栄養膜細胞間隙マーカー、内皮細胞マーカー等を染色した。

In vivo 胎児胎盤系におけるヒポタウリン動態およびヒポタウリン欠乏の改善方法を解明するため、エズリンヘテロノックアウトマウス同士を交配させた妊娠マウスに妊娠8日目より浸透圧ポンプを用い持続的にヒポタウリンを投与し、妊娠18日目まで継続的に母体血漿中ヒポタウリン濃度を測定した。妊娠18日目に胎児胎盤系におけるヒポタウリン濃度を測定した。

4. 研究成果

血液胎盤関門モデル細胞株であるTR-TBT18d-1の細胞内にはヒポタウリンが濃縮的に存在することが示され、能動的取込み輸送機構あるいは生合成により細胞内のヒポタウリン濃度が維持されると考えられた。TR-TBT18d-1細胞の培養液添加用ウシ血清を透析することにより培養液中のヒポタウリンを除去したところ、TR-TBT18d-1細胞内のヒポタウリンは顕著に減少した。さらに、ヒポタウリンのみを添加したところTR-TBT18d-1細胞内のヒポタウリン濃度は回復した。これらより、絨毛性栄養膜細胞においては、細胞外より濃縮的にヒポタウリンを取込み輸送することで、細胞内の高濃度のヒポタウリンを維持していることが考えられた。

ヒポタウリン輸送への関与が推察されていたSlc6a13に対し、エズリンがタンパク-タンパク相互作用により輸送活性を促進するかを検討した。HEK293細胞を用い、エズリンおよびSlc6a13の遺伝子を共発現させることを試みた。効率的に研究を推進するため、予備検討としてSlc6a13の輸送基質として[3H]GABAを用いた。[3H]GABAのSlc6a13による輸送活性はエズリンとの共発現によりわずかに上昇した。Michaelis-Menten速度式より、エズリンはSlc6a13の輸送機能に対し、最大速度は変化させず、親和性を増大させることが示された。しかし、HEK293細胞では内因性エズリンの発現量が高いため、エズリンとSlc6a13との共発現の効果は過小評価されていると考えられ、実験条件を改善したのちに追加解析が必要であると示唆された。

Slc6a13の胎盤における局在は絨毛性栄養膜細胞層のうち、母体血側細胞膜に発現するとの仮説を検証した。免疫染色の結果、絨毛性栄養膜細胞における発現が観察された。し

かしながら、詳細に局在解析を続けた結果、絨毛性栄養膜細胞層の胎児側細胞膜に多く局在する可能性が高いことが示された。このことは、母体血から胎盤へのヒポタウリンの移行にはSlc6a13とは異なるトランスポーターが関与すること、さらには当初は予測されていなかった胎児から胎盤へのヒポタウリン供給機構が存在し、その実体としてSlc6a13が関与する可能性があることを意味する。他のSlc6aトランスポーターがヒポタウリン輸送に関与する可能性について検討した結果、Slc6a6についてもヒポタウリンを基質とすることを明らかとした。ただし、親和性と血中濃度の観点からヒポタウリン輸送への寄与は小さいことが示唆された。

マウス胎盤においてトランスポーターを介したヒポタウリン供給機構を解明するため、エズリンヘテロノックアウトマウス同士を交配した妊娠マウスを用い、妊娠初期より持続的にヒポタウリンを投与した。ヒポタウリン投与マウスにおいて母体血中のヒポタウリン濃度は2-3倍に増加した。妊娠18日目において胎児胎盤系におけるヒポタウリン含有量を測定したところ、胎盤におけるヒポタウリン濃度はいずれの遺伝子型においても上昇したが、胎児血中におけるヒポタウリン濃度は有意な上昇は得られなかった。母体血中濃度で規格化した胎盤胎児中のヒポタウリン濃度解析により、母体から胎盤への移行には飽和性が観察され、トランスポーターの関与が考えられた。さらにエズリンノックアウトマウス胎盤においては母体からの取込み輸送が失活していることが観察された。また、胎児への移行性においてもいずれの遺伝子型においても顕著な飽和性が観察された。またこのヒポタウリン投与実験において、マウス成長不全は改善されないことがわかった。これらの検討結果により、胎児胎盤系には、ヒポタウリンを母体血より取込み輸送するトランスポーターが関与しているが、その親和性は母体血中濃度と同程度であり、胎児のヒポタウリン欠乏症に対して母体の血中のヒポタウリン濃度を上昇させることではトランスポーターの飽和性の原因により、胎児血中濃度の改善を達成するに至らないと考えられた。

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)

(1) 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.* 2012;27(4):439-46.

(2) 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.* 2011 Sep;100(9):3959-67.
doi: 10.1002/jps.22624.

[学会発表] (計11件)

(1) Asada T, Takanohashi T, Nishimura T, Kose N, Tomi M, Nakashima E., 26th JSSX Annual Meeting, Hiroshima Japan, 2011/11

(2) Sugita Y, Higuchi K, Kamata K, Nishimura T, Kose N, Sai Y, Tomi M, Nakashima E., Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2011, Kuala Lumpur Malaysia, 2011/12

(3) Oda K, Nishimura T, Kose N, Tomi M, Nakashima E., Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2011, Kuala Lumpur Malaysia, 2011/12

(4) Duereh M, Nishimura T, Sugita Y, Kose N, Tomi M, Nakashima E., Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2011, Kuala Lumpur Malaysia, 2011/12

(5) Sugita Y, Higuchi K, Kamata K, Nishimura T, Kose N, Sai Y, Tomi M, Nakashima E., International Symposium on Past, Present and Future of Molecular Pharmacokinetics, Tokyo Japan, 2012/01

(6) Duereh M, Higuchi K, Nishimura T, Kose N, Tomi M, Nakashima E., International Symposium on Past, Present and Future of Molecular Pharmacokinetics, Tokyo Japan, 2012/01

(7) 西村友宏, 田中純, 登美斉俊, 巨勢典子, 中島恵美, 日本薬剤学会第 26 年会, 東京, 2011/05

(8) 小田憲司, 西村友宏, 巨勢典子, 登美斉俊, 中島恵美, 日本薬剤学会第 26 年会, 東京, 2011/05

(9) 杉田友紀, 鎌田可奈子, 西村友宏, 巨勢典子, 崔吉道, 登美斉俊, 中島恵美, 第 6 回トランスポーター研究会年会, 仙台, 2011/06

(10) 小田憲司, 西村友宏, 巨勢典子, 登美斉俊, 中島恵美, 第 6 回トランスポーター研究会年会, 仙台, 2011/06

(11) Mariam Duereh、西村友宏、巨勢典子、登美斉俊、中島恵美, 第 55 回日本薬学会関東支部大会, 船橋, 2011/10

6. 研究組織

(1) 研究代表者

巨勢 典子 (Kose Noriko)
慶應義塾大学・薬学部・研究員
研究者番号:

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし