

ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的評価

所 属 東京大学大学院薬学系研究科
研究者 澤田康文

研究要旨：胎盤組織の入手、灌流実験、その結果の解析法について検討した。また、胎盤における各種アニオン輸送担体の発現を確認し、OAT4 の機能と局在について検討した。以上の検討より、胎盤試料を用いて物質の胎盤透過性を評価する上で重要な知見を提供できた。(119/120)

分担研究者

- (1) 九州大学大学院薬学研究院 大谷壽一、辻本雅之
- (2) 九州大学大学院医学研究院 月森清巳

A. 研究目的

薬物の有害反応の中でも、胎児毒性は最も注意しなければならない毒性の一つであり、妊婦への薬物投与は特に慎重に行われなければならない。一方、さまざまな疾患の治療のために、妊娠中にもかかわらず薬物の投与を受けなければならない妊婦も少なからず存在する。しかしながら、現在臨床で使用されている薬物のほとんどは、妊婦に投与した場合、胎児に対する安全性が保証されていない。また近年では、薬物以外の環境汚染化学物質や環境ホルモンなどによる胎児毒性も深刻な問題となっている。

母体に投与された薬物などの生体異物は胎盤を介して胎児へと移行するが胎盤には血液胎盤関門が存在し、ここでの物質移行は厳密にコントロールされている。したがって、薬物の胎児毒性を評価する上では、その胎盤透過性、胎児移行性を評価することが必要不可欠である。このため多くの医薬品については、開発段階において、マウスなどの動物を用いて胎児移行性の評価が行われている。しかし、ヒトとマウスの胎盤は構造的に全く異なっており、また、血液胎盤関門では動物種ごとに機能特性を異にする薬物輸送担体が発現しているため、薬物の胎児移行性を評価するためにはヒト胎盤を用いた多面的なアプローチが不可欠といえる。

そこで本研究においては、まず、ヒト胎盤試料

の供給について検討した。すなわち、ルーチンの医療業務の中で得られる胎盤試料の提供条件が、薬物・異物の経胎盤輸送特性を評価する実験の成否や信頼度に与える影響を明らかにし、研究に必要な胎盤を円滑に供給するための手順を確立することを目的とした。次に、モデル薬物としてアンチピリンとサリチル酸を取りあげ、ヒト胎盤灌流法によりこれら薬物の胎児移行性について評価した。ここでは、母体側に薬物を含む灌流液を灌流した際に胎児血に現れる薬物の濃度を評価する(母体側薬物灌流実験)だけではなく、胎児側薬液灌流実験や灌流後 washout 実験などといったさまざまなプロトコルの実験を組み合わせて行うとともに、それらの結果を評価するための pharmacokinetic モデルの構築と適用を試みた。さらに、血液胎盤関門の機能を *in vitro* 系でより詳細に検討するために、血液胎盤関門の本体と考えられている胎盤シンシチオトロホプラスト細胞の単離・培養条件を検討した。シンシチオトロホプラスト細胞は融合・多核化した合胞体細胞であり、これをインタクトの状態で単離することは困難だが、ヒト胎盤絨毛のシンシチオトロホプラスト細胞層の内側には、サイトトロホプラスト細胞(細胞栄養層細胞)が存在し、これが融合、合胞体化することによりシンシチオトロホプラスト細胞へと変化する。このため、サイトトロホプラスト細胞を効率よく精製し、初代培養すると共に、これを融合、合胞体化することによりシンシチオトロホプラスト細胞層を得るための方法論を構築すると共に、これを用いた物質の経細胞輸送実験の feasibility を検討することを目的とした。最後に、胎盤に発現している薬物輸送担体について検討を加えた。ここでは、アニオン系薬物の胎盤透

過過程に着目し、organic anion transporter (OAT) ファミリー及び organic anion transporting polypeptide (OATP) ファミリーの胎盤における発現を確認することを目的とした。そして、発現が確認されたアイソフォームのうち、OAT ファミリーの中で唯一胎盤で高発現しており、親水性の高いアニオンを輸送することが考えられる OAT4 について、その胎盤における機能的役割を明らかにするとともに、アニオン性薬物の胎盤透過性を *in vitro* の実験系から予測するための方法論を模索することを目的とした。

最終的には、ヒト胎盤試料（ヒト胎盤灌流実験系、ヒト胎盤由来微絨毛膜小胞、同基底膜小胞、ヒト胎盤由来トロホプラスト初代培養細胞）を用い、さまざまな実験系を組み合わせ、薬物の胎児移行性を定量的に評価するための評価系を確立することを目的とした。

B. 研究方法

研究における胎盤の供給という観点からは、対象となる胎盤は、予定分娩（帝王切開）又は自然分娩のいずれかにより娩出される。予定分娩においては、胎盤を用いる実験者も十分な準備の元で待機できるが、自然分娩の場合は、胎盤の娩出時刻が予定できないことから、実験試料としての提供には困難を伴うことも多い。このため、実際に娩出された胎盤をさまざまな種類の実験に用いた場合、胎盤の娩出形態や、実験に用いるまでの保存・処理条件等が実験の成否に及ぼす影響について、解析を行った。

In vitro ヒト胎盤灌流ではまず、胎盤から直径 4-6 cm のコチレドンを選択し、胎児側血管にカテーテルを挿入・結紮した後、灌流液で脱血を行った。次にコチレドンを切り取り、灌流装置にセットした後、胎児側を灌流した。母体側は、絨毛間腔に三叉の針を刺入し、灌流した。最初の 30 分間は薬物を含まない灌流液を胎児側、母体側に灌流し、安定化を行った。灌流実験のプロトコルは、母体から胎児への輸送をみる灌流実験（母体側薬物灌流実験）、胎児から母体側への輸送をみる灌流実験（胎児側薬物灌流実験）、及び washout 灌流実験の三種について行った。薬物としてはサリチル酸 (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 及びアンチピリン (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を検討した。灌流実験のデータ解析にあたっては、アンチピリンについては dead volume compartment、intervillous compartment 及び placental compartment の 3 つのコンパートメントを考慮したキネティックモデルを、サリチル酸

については、dead volume compartment、intervillous compartment、placental compartment 及び fetal venous compartment の 4 つのコンパートメントを考慮したキネティックモデルを構築した。三種のプロトコルにおける個々の灌流実験における母体側灌流液中濃度、胎児側灌流液中濃度及び胎盤組織中薬物量の経時変化に、各コンパートメントにおけるマスバランス式をあてはめ、キネティックパラメータを算出した。

胎盤トロホプラスト細胞の単離では、胎盤を、娩出後速やかに PBS で洗浄し、絨毛相当部位を切り出した。これを細切後、100 mL の Digestion buffer (後述の HBSS buffer に trypsin 2.8 g/L 及び Dispase II を含む) 中でインキュベートした。インキュベート液をピペティングすることにより細胞を遊離させ、濾過後遠心した。ペレットを再懸濁し、Percoll gradient により目的の分画を分取し、HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) buffer を添加し、攪拌後遠心した。上清を除去後、ペレットに DNase I buffer 15 mL を添加し、37°C で 15 分間インキュベートした。これを遠心し、ペレットを HBSS buffer で洗浄した後に再度 Percoll gradient にかき、目的の分画を分取した。得られたペレットに RPMI buffer を加え懸濁後遠心し、ペレットを M199 で懸濁して細胞数を測定した。生細胞数の確認は、トリパンブルー染色により行った。

胎盤における OAT ファミリー及び OATP ファミリーの発現確認は、RT-PCR 法により行った。すなわち、ヒト満期胎盤より単離したトロホプラスト細胞、ヒト満期胎盤組織、並びに胎盤絨毛癌由来培養細胞 (BeWo 細胞) より total RNA を抽出し、RT-PCR を行った。ヒト OAT4 の機能は、OAT4 安定発現細胞 (HEK-OAT4) を構築し、これを用いて評価した。すなわち、ヒト腎臓 cDNA をもとに、OAT4 の open reading frame を含む pIRES-OAT4 を作成後 HEK 293 細胞にトランスフェクトした。HEK-OAT4 の輸送機能は、 ^3H エストロン-3-硫酸の取り込み活性により評価した。OAT4 のシンシチオトロホプラスト細胞における発現は、ヒト胎盤より単離精製したシンシチオトロホプラスト細胞刷子縁膜 (brush border membranes, BBM) 及び同細胞基底膜 (basal membranes, BLM) を用いて

Western blot 法により評価した。両膜の精製度は、基底膜のマーカーとして dihydroalprenolol の結合活性を、刷子縁膜のマーカーとして alkaline phosphatase (ALP) 活性を測定し、胎盤ホモジネートと比較することにより評価した。基底膜を介したシンシチオトロホプラスト細胞への薬物の取り込みは、BLM より調製した膜小胞 (blush-border membrane vesicles) への放射標識した基質の取り込みを、常法により測定した。

(倫理面への配慮)

本研究の開始時点においてすでに、分担研究者らは胎盤を研究試料とした実験 (研究題目:「胎盤における薬物輸送担体及び薬物受容体の発現及び機能と遺伝子型との関係解明」) に関して、九州大学医学部の倫理審査委員会において承認を受けていた。しかし、上記の研究計画では、遺伝子診断を行うことを前提に胎盤提供者の同意を得ることとなっていたため、同意を得られない場合も多く、胎盤の提供効率が悪かった。また、研究協力者が勤務する九州大学病院以外の医療機関からも胎盤の提供を受けられる見通しが立った。このため平成 16 年中に改めて、遺伝子診断を伴わない薬物輸送特性解析実験に関して、「ヒト胎盤を用いた血液胎盤関門の機能解析」の研究題目で倫理審査を申請し、九州大学医学研究院等倫理委員会より承認を受けた上で、対象被験者を広げて研究を遂行した。研究にあたっては上記委員会による承認された研究計画を遵守するとともに、胎盤の提供については、上記委員会により承認された書式の提供同意書を用いて文書による同意を得た上で研究に供した。

C. 研究結果

まず、胎盤灌流実験の成功率に及ぼす胎盤の採取条件の影響を検討した。その結果、胎盤灌流に供した胎盤のうち、帝王切開により提供されたものについては、成功率は 30/39、自然分娩については 3/4 と、両者に差異は認められなかった。すなわち、脱血操作までが順調に行えた胎盤については、帝王切開、自然分娩を問わず、約 75% が胎盤灌流実験に使用可能であることがわかった。

次に、BBMVs 及び BLMVs を用いた薬物の取り込み輸送実験に関する、胎盤の採取条件について検討した。血液胎盤関門における薬物の移行特

性を膜小胞を用いて検討するためには、BBM と BLM がそれぞれ分離して良好に精製される必要がある。解析の結果、十分な精製度条件を満たす膜画分を採取する上で、重要な要因であったのが、胎盤胎児血管内の血液の凝固状態であった。すなわち、膜小胞の精製においても、胎盤灌流実験と同様、最初に胎児側動脈から灌流液を灌流し血管内を脱血するが、この脱血操作によりほとんど脱血が出来ない場合には、膜小胞も十分な精製度が得られなかった。逆に、脱血操作までが順調に完了すれば、その後の膜小胞の精製操作は、冷蔵下 overnight 保存後に行った場合でも、十分な精製度を得ることが出来た。最後に、サイトトロホプラスト細胞の単離に供する胎盤であるが、胎盤灌流実験と同様、脱血操作までが順調に行えた胎盤については、良好なバイアビリティで目的とする細胞の単離・精製が可能であった。

胎盤灌流実験に関して、母体側薬液灌流実験においては、実験開始後、アンチピリン、サリチル酸ともに速やかに胎児側灌流液中に検出され、母体側及び胎児側の両灌流液中濃度は灌流開始後約 15 分でほぼ定常状態に達した。定常状態において単位時間あたりに胎盤を透過する物質の比を表す TPTss 値はアンチピリンで 7.9%、サリチル酸で 5.7% であった。アンチピリンの胎児側薬液灌流実験開始後、アンチピリンの胎児側灌流液中濃度は速やかに一定となり、母体側へのアンチピリンの透過はわずかであった。同様に、サリチル酸も胎児側薬液灌流実験開始後、胎児側灌流液中濃度は速やかに一定となり、同様に母体側への透過はわずかであった。今回新たに構築した薬物の経胎盤透過に関する薬物動態学的モデルは、これらの灌流実験の結果を良好に表現することができた。

トロホプラスト細胞の単離及び初代培養の条件に関しては、細胞の形態学的観察の結果、概ね三日目程度より細胞の融合及び核の集合を特長とする合胞体化 (シンシチオ化) が観察されたが、プレート全面を被覆するまでには至らなかった。これに対して、FCS コーティングした場合には、細胞は培養面のほぼ一面に広がり、細胞の集合による融合細胞間の境界が観察できなくなった。続いて、トランスウェル上に単離した細胞を播種 (4×10^5 cells/well) し、5 日後にジゴキシン及びエストロン-3-硫酸の基底膜側から頂膜側 (B to A) 及び頂膜側から基底膜側 (A to B) への輸送を検討

したところ、その輸送は非常に大きく、paracellular marker であるマンニトールとほぼ同等で、かつ方向性も認められなかったことから、この条件では、細胞が十分に confluent に達していないと考えられた。さらに、トランスウェル上に播種後の膜抵抗値についても、培養日数に伴う膜抵抗値の上昇は観測されず、その絶対値も細胞を播種していないトランスウェルとほぼ同値であった。続いて、単離トロホプラスト細胞へのエストロン-3-硫酸の取り込み活性を検討した。単離した細胞を播種して 2 日後におけるエストロン-3-硫酸 (7 nM) の取り込みの経時変化を、37°C 及び 4°C において検討したところ、取り込みは経時的に増大し、37°C において 4°C と比較して有意に高い取り込みが観察された。

ヒト胎盤組織、胎盤トロホプラスト細胞及び BeWo 細胞における RT-PCR を用いた発現確認の結果、OATP-D, OATP-E 及び OAT4 のアイソフォームがいずれも発現していた。また、胎盤組織においては OATP-B の発現が確認されたが、OATP-C, OATP8, OAT1, OAT2 及び OAT3 の発現は確認されなかった。また、OAT4 は、胎盤トロホプラスト細胞の基底膜に優位な発現が確認された。

構築した HEK-OAT4 細胞における $[^3\text{H}]$ estrone-3-sulfate の取り込みは、濃度依存性を示し、その親和性定数 K_m 値は $20.9 \mu\text{M}$ であった。また、その取り込みは細胞を glutarate のプレインキュベーションにより優位に増強された。続いて、胎盤から調製した BLMVs への $[^3\text{H}]$ estrone-3-sulfate の取り込みを検討したところ、膜小胞の放射活性は顕著な濃度依存性を示した。しかしながら、この放射活性は OAT の典型的基質・阻害剤であるプロベネシド (1 mM) によってもほとんど低下せず、さらに、膜小胞外液を高浸透圧条件にしても、放射活性が低下しなかった。逆に、OAT4 の機能を阻害しないことが報告されている β エストラジオール ($100 \mu\text{M}$) によって有意な阻害が認められた。このことから、今回の実験条件においては、 $[^3\text{H}]$ estrone-3-sulfate は、膜小胞へ取り込まれたのではなく、その多くが、膜小胞表面に存在しステロイド構造を認識する飽和性の結合部位に結合したものと考えられた。

D. 考察

まず、胎盤試料を薬物経胎盤透過性の評価における材料として用いる場合には、その実験系に応じた適切な提供手順を構築・運用することが必要であると考えられた。胎盤灌流実験に用いる胎盤については、高い鮮度が必要であり、娩出後速やかに実験者に提供する必要がある。したがって、胎盤灌流実験については、可能な限り帝王切開による胎盤を優先的に提供するとともに、医療機関と同一敷地内またはごく近隣に実験設備を具備すべきであるとする。トロホプラスト細胞由来膜小胞を調製する場合についても、胎盤灌流実験と同様、可能な限り新鮮な胎盤が望ましい。しかしながら、脱血操作を行った上で冷蔵しておけば、その後の調製操作までに一定の時間があっても実験に供することが出来ることがわかった。また、脱血後の脈管への空気の流入などに対しても比較的寛容であった。したがって、自然分娩の胎盤であっても、また医療機関と実験施設の間にある程度の距離がある場合においても、適切な時期に脱血を行い、冷蔵して輸送・保管すれば、実験に供することは可能であろう。最後に、サイトトロホプラスト細胞の単離に供する場合は、組織を直接細切するため脱血後の血管内への空気の侵入に関しては灌流実験と比較して問題を生じにくい、その他の点については、ほぼ胎盤灌流と同様の提供手順により供給することで、十分に実験に用いることが可能と考えられた。

現在までに報告されているヒト胎盤灌流法を用いた研究は、単に定常状態における母体側と胎児側の濃度比を求めるだけにとどまっており、薬物の経胎盤輸送キネティクスの詳細な動態学的解析は行われていなかった。そこで、本研究では、複数の灌流プロトコル、すなわち、母体側薬物灌流実験のみならず、胎児側薬物灌流実験及び washout 灌流実験を行い、薬物動態学的モデルを構築してその結果を解析したところ、胎児側からの薬物の流入や胎盤からの薬物の流出過程などを精度良く評価することができた。よって、これら複数の灌流プロトコルと、今回構築した薬物動態学的モデルを用いることで薬物の胎盤透過性を詳細に検討することが可能となった。なお、胎盤灌流実験におけるアンチピリンの平均回収率は 82.6% と低かったが、この結果は既報の結果と一致する。そこで、今回の解析に用いたモデルに胎盤からの消失速度定数 k_s をおいて解析を行った結果、 k_s は 0.366 min^{-1} と算出された。低い回収

率の原因として、胎盤内でのアンチピリンの代謝が考えられる。これまで、胎盤サンプルを用いたアンチピリンの代謝実験は報告されていないものの、アンチピリンは様々なチトクローム P450(CYP)の分子種によって代謝されること、並びに、胎盤には CYP1A2 及び CYP2C ファミリーが mRNA レベルで、CYP3A4 が蛋白レベルで発現していることが報告されていることから、アンチピリンが胎盤内で代謝される可能性が考えられる。今後は、ヒト胎盤ホモジネートを用いた、胎盤組織における薬物代謝に関する検討も行う必要があるかもしれない。

また本研究では、胎盤及び BeWo 細胞における、有機アニオンを輸送する代表的な輸送担体の発現を確認した。その結果、OATP-D, E 及び OAT4 の発現が確認され、この発現パターンは BeWo 細胞と一致していた。したがって、BeWo 細胞は胎盤におけるアニオンの透過を検討する上で有用な培養細胞系かもしれない。しかし現在までに、他のトランスポータに関して実際のヒト胎盤組織と BeWo 細胞の間で発現の相違が確認されていることや、各種アニオン輸送系の発現量の比や絶対量などがヒト胎盤組織と BeWo 細胞の間で異なる可能性も否定できないため、やはり薬物の経胎盤輸送特性をスクリーニングするにあたってはヒト胎盤組織由来の試料を用いることが適当であろう。

抗 OAT4 抗体を用いた Western blot 法により、ヒト胎盤組織より調製したシンシチオトロホプラスト細胞の BBM 及び BLM において、OAT4 に対応する約 70 kDa のバンドが検出された。アミノ酸配列から推定される OAT4 のサイズは約 53 kDa であるが、OAT4 には *N*-glycosylation site が存在することから、このサイズの違いは glycosylation に起因しているものと考察される。構築した HEK-OAT4 細胞は、Mock 細胞と比較して、OAT4 の典型的基質である estrone-3-sulfate を良好に取り込み、その取り込みはジカルボン酸のプレロードにより増強されたことから、ジカルボン酸との交換輸送であると考えられた。生理的にもジカルボン酸との交換輸送として機能している可能性が高い。

続いて、安定発現系で確認した OAT4 の輸送特性と、実際の胎盤トロホプラスト基底膜におけるアニオン性物質の輸送機能との対応を確認するために、ヒト満期胎盤から調製した BLMVs へ

の [³H]estrone-3-sulfate の取り込みを検討した。その結果、膜小胞の放射活性は顕著な濃度依存性を示したが、この放射活性は OAT の典型的基質・阻害剤であるプロベネシド(1 mM)によってもほとんど低下せず、さらに、膜小胞外液を高浸透圧条件にしても、放射活性が低下しなかった。胎盤における OAT4 の生理的役割を BLMVs を用いて評価するためには、他の OAT4 の基質を用いる必要があるだろう。

以上、ヒト胎盤組織の提供、それを用いた胎盤灌流実験、膜小胞を用いた実験、初代培養細胞を用いた実験などを行い、ヒト胎盤組織を用いた実験の可能性と限界について総合的に検討した。薬物の胎児移行性を評価するためには、これらの実験系の利点と限界を十分に把握した上で、評価系として用いる必要があるだろう。今後は、これらさまざまな実験系における実験結果・解析結果を統合して、薬物の胎児移行性を代表するような指標を構築する必要があるかもしれない。

E. 結論

日常医療の中で娩出される胎盤を、薬物の経胎盤輸送を解明するための研究に供するにあたっての提供条件や提供手順を明らかにすることが出来た。また、胎盤灌流実験の結果に薬物動態学的モデルを適用することで、薬物の胎盤透過における素過程をそれぞれ分離して、定量的に評価することができた。さらに、ヒト胎盤組織から比較的簡易な操作でトロホプラスト細胞を単離する条件を確立することが出来た。得られたトロホプラスト細胞は、通常の培養条件下で 3 日間程度でシンシチオ化し、FCS コーティングしたプレート上では良好な単層細胞を形成した。今後、シンシチオトロホプラスト層を介した方向性の輸送特性を検討するためには、トランスウェル上で単層膜を形成させるような条件を検索する必要があるだろう。最後に、胎盤において、OATP-B, D, E 及び OAT4 の mRNA レベルでの発現を確認した。また、ヒト胎盤シンシチオトロホプラスト細胞基底膜における OAT4 の発現が蛋白レベルで確認された。さらに、その輸送特性はジカルボン酸との交換輸送であることが示された。しかしながら、基底膜における OAT4 の役割を定量的に明らかにするためには、基底膜への結合能が小さい OAT4 の基質を探索してこれを用いることが必要であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 山下史哲, 小薮紀子, 中村崇規, 内海健, 桑野信彦, 永田秀昭, 佐藤昌司, 月森清巳, 中野仁雄, 辻本雅之, 大谷壽一, 澤田康文, ヒト胎盤に発現している有機アニオントランスポーター OAT4 の輸送解析, 第 19 回日本薬物動態学会年会 (金沢, 2004 年 11 月), 講演要旨集, p 232.
- 2) 新宅恭平, 有馬由佳, 辻本雅之, 永田秀昭, 佐藤昌司, 月森清巳, 中野仁雄, 大谷壽一, 澤田康文, ヒト胎盤灌流法を用いた非ステロイド性消炎鎮痛剤の胎盤透過性の検討, 第 19 回日本薬物動態学会年会 (金沢, 2004 年 11 月), 講演要旨集, p 258.
- 3) 山下史哲, 小薮紀子, 中村崇規, 内海健, 桑野信彦, 永田秀昭, 佐藤昌司, 月森清巳, 中野仁雄, 辻本雅之, 大谷壽一, 澤田康文, ヒト胎盤に発現している有機アニオントランスポーター OAT4 の輸送特性, 第 21 回日本薬学会九州支部大会 (長崎, 2004 年 12 月), 講演要旨集, p 15.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし