

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書（Ⅱ）

平成18年度

政策創薬総合研究

重点研究報告書（Ⅱ）

目 次

KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法 (DLI) の実用化	藤原成悦 ……	589
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字 ……	636
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 ……	656
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 ……	671
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 ……	680
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 ……	691
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 ……	707
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹 ……	720
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治 ……	728
KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 ……	740
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 ……	761
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 ……	772
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 ……	783
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 ……	795
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 ……	814
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 ……	826
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二 ……	836
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 ……	839
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 ……	919
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明 ……	939
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法の確立に関する研究	乾 賢一 ……	951
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘 ……	966

KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 ……	979
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間 正充 ……	1000
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込型細胞チップとナノセンサーによる新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサーの開発	永森 静志 ……	1021
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤の開発	西尾 和人 ……	1042
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野 泰雄 ……	1054
KH72077	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	澤田 康文 ……	1070
KHB1201	タンパクリン酸化酵素SIKの糖・脂質代謝における役割と創薬標的評価系の開発	竹森 洋 ……	1080
KHB1202	家族性黄斑変性カニクイザルを用いた加齢黄斑変性の新規治療及び予防薬の開発	寺尾 恵治 ……	1086
KHC1203	弱毒性ウイルスワクチンの品質向上、生産性向上に関する研究	大隈 邦夫 ……	1090
KHC1204	チオレドキシシンなど抗酸化反応性活性酸素種処理分子の高発現を促す新しい健康増進医薬の開発	井上 達 ……	1096
KHC2206	腹膜癒着予防剤の開発と応用	土肥多恵子 ……	1106
KHD1205	ヒト乾燥羊膜の機能再生医療材料への実用化に関する研究	阿久津英憲 ……	1111
KHD2207	ヒト由来細胞・組織バンクの活用拡大のためのシステム構築と研究資源の高度化に関する研究	後藤 雄一 ……	1115

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

研究期間 平成16年4月～平成19年3月

研究要旨：ヒト胎盤灌流実験とモデル解析の応用により、ヒトにおける胎児毒性を予測できる可能性が示された。薬物の経胎盤透過に重要な輸送担体の発現や特性を解明することができた。薬物の胎児移行性・胎児毒性の評価にヒト胎盤試料を用いることの有用性が示された。

分担研究者

- (1) 東京大学大学院薬学系研究科 大谷壽一、堀 里子
- (2) 九州大学大学院医学研究院 月森清巳
- (3) 九州大学大学院薬学研究院 (現：京都薬科大学) 辻本雅之

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。

薬物の胎児毒性を評価する上では、まず、その胎盤透過性・胎児移行性を評価する必要がある。実験動物として頻用されるラットなどは胎盤の構造などがヒトとは大きく異なるため、前述の目的のためにはヒト胎盤を試料として用いて評価する必要がある。ヒト胎盤は出産に伴い娩出され、特に被験者に侵襲を与えることなく入手可能なほぼ唯一のヒト臓器といえる。本研究では、ヒト胎盤を活用した胎盤灌流実験、胎盤由来膜小胞での輸送実験、並びに胎盤由来培養細胞系での輸送実験などを行うとともに、分子生物学的手法も併用して、薬物の胎児移行性を定量的に評価するための方法論を構築し、評価することを目的とした。さ

らには、薬物動態・動力学的手法を用いて、前述の実験により得られた成果を胎児毒性の予測に役立てることも目的とした。

ヒト胎盤灌流実験は、ヒト胎盤を用いた最も代表的な実験系であるが、入手や利用のノウハウが限られており、また薬物透過機構の評価への活用も試みられていない。このため、胎盤灌流実験の結果をモデル解析し、より詳細な胎盤透過過程の解析を行うこととした。

またヒト胎盤試料から単離トロホプラスト細胞、トロホプラスト細胞の微絨毛膜小胞 (BBMV_s)、基底膜小胞 (BLMV_s) を調製し、これらへの薬物の取り込みやこれらにおける薬物輸送担体の発現などを評価することで、薬物の胎盤透過特性をより詳細に解明することを目的とした。具体的には、特に胎児毒性が問題となる薬物が多いアニオン系薬物の胎児移行を解明すべく、organic anion transporter 4 (OAT4)、organic anion transporting polypeptides (OATPs)、monocarboxylate transporters (MCTs) などの発現、典型的基質の輸送特性などを胎盤由来試料を用いて検討し、各輸送担体の発現系 (安定発現細胞や cRNA 注入卵母細胞など) における輸送特性との比較評価を行うこととした。

本研究の遂行により、薬物はもちろんのこと、その他の化学物質や環境汚染物質の胎児移行性を、*in vitro* における実験結果から予測することが可能になる。

B. 研究方法

胎盤の供給という観点から、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、各種の実験の成否に及ぼす影響について、解析した。

ヒト胎盤灌流は、既報の single pass dual perfusion 法とし、母体側薬物灌流実験、胎児側薬物灌流実験、及び washout 灌流実験の三種のプロトコルで行った。薬物としてはアンチピリン、サリチル酸、ジクロフェナク、パロキセチンを検討対象とした。また、胎盤灌流実験において阻害剤を同時灌流した場合の薬物の経胎盤移行動態の変化についても検討した。灌流液中及び組織中の各薬物濃度の測定は、HPLC-UV 法により行った。さらに、灌流実験のデータ解析にあたっては、胎盤について2つ又は3つの well-stirred compartment を考慮したキネティックモデルを新規に構築し、個々の灌流実験におけるそれぞれの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非線形最小二乗法によりあてはめ、胎盤透過のキネティックパラメータ (TP-PK パラメータ) を算出した。アンチピリン、サリチル酸、ジクロフェナクについては灌流液中の蛋白 (アルブミン) への結合率を平衡透析法により測定し、TP-PK パラメータの値を非結合型に換算した。

得られた TP-PK パラメータを用いて、妊婦に NSAIDs を投与した際の胎児における血中薬物濃度推移を推定し、これと動物実験における各薬物の胎児毒性に関する濃度作用関係、又は各薬物のシクロオキシゲナーゼ (COX) 阻害活性の報告値とを併せて解析することで、ヒトにおける NSAIDs の胎児毒性の予測を行った。

胎盤における OATs, OATPs, MCTs の発現は、RT-PCR 法により確認した。すなわち、ヒト満期胎盤組織に加え、単離トロホプラスト細胞やヒト胎盤絨毛癌由来培養細胞 (BeWo 細胞, JAR 細胞, JEG-3 細胞など) も一部評価対象とした。また、OAT4 の発現局在は、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。

ヒト胎盤からの単離トロホプラスト細胞の調製は、既報の方法に改良を加えて行った。単離したトロホプラスト細胞をコラーゲンコートしたマル

チウエルディッシュに播種し、12 時間後及びその後、24 時間ごとに培地を交換し、細胞の形態を位相差顕微鏡下で観察した。培養過程における EGF、SB203580、sodium nitroprusside (SNP)、estradiol の影響を検討した。また、トランスウエル上に播種した場合は膜抵抗値の測定も行った。単離トロホプラスト細胞への放射標識基質の取り込み特性は、常法に従い評価した。単離トロホプラスト細胞の培養経過に伴う OATPs の発現変動については、realtime PCR 法により検討した。

ヒト OAT4, OATP-B などの機能は、それぞれの遺伝子をクローニングし、ヒト腎由来 HEK 293 細胞にトランスフェクトすることで構築した安定発現細胞を用いて、それらの細胞に対する基質の取り込みにより評価した。ヒト MCT1, MCT4 の機能は、アフリカツメガエル卵母細胞外来遺伝子発現系を用いて、それぞれの cRNA を注入した卵母細胞への基質の取り込みにより評価した。

(倫理面への配慮)

本研究は、九州大学医学研究院等倫理委員会及び東京大学医学部の倫理委員会より承認を受けた上で遂行した。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。

なお、本研究においては、胎盤試料は連結不可能匿名化としており、胎盤提供者の個人情報 は 消 除 され た 形 で 研 究 に 供 さ れ て い る。

C. 研究結果

日常医療の中で娩出される胎盤を胎盤灌流実験に提供する場合には、すみやかな脱血・灌流が可能な提供手順と、実験施設等の配置等を考慮することが重要であった。これにより、概ね 75% 以上の割合で胎盤灌流実験が成功した。その他の実験に用いる場合にも、すみやかな提供手順が、実験の成否の鍵であった。

胎盤 (母体側薬液) 灌流実験から得られたアンチピリン、サリチル酸、ジクロフェナク、パロキセチンの TPTss 値はそれぞれ 6.94%, 4.13%, 2.22%, 約 0.8% であった。また、灌流液中のアニオンのうち 35 mM を MCTs の基質である L-乳酸に弛緩したところ、単純拡散マーカであるア

ンチピリンの TPTss 値に有意な変化はなかったが、ジクロフェナクの TPTss 値は 1.54% に有意に低下した ($P < 0.05$)。

さまざまなプロトコルでの灌流実験の結果に、新規に構築した薬物の経胎盤透過を表現するコンパートメントモデルをあてはめたところ、モデルは実測値を良好に表現することができ、K1, K4 (それぞれ母体血及び胎児血から胎盤へのインフラックスクリアランス), k2, k3 (それぞれ胎盤から母体血及び胎児血への排出速度定数) 及び ks (胎盤からの消失速度定数) といった各素過程の TP-PK パラメータを算出することができた。ただし、アンチピリンについては胎盤組織と胎児血管の間に瞬時平衡を仮定しハイブリッドパラメータ K4/k3 として算出する必要があった。

各 NSAIDs をヒトに投与後の薬物体内動態と、今回算出した TP-PK をもとに、ヒト胎児血漿中 NSAIDs 濃度推移が予測できた。この予測濃度推移を、既報の文献の遡及的解析により得られた、NSAIDs の動脈管収縮作用や COX 阻害の血中濃度-作用関係と比較したところ、ジクロフェナクについてはほぼ同等の濃度であったが、アンチピリンとサリチル酸については、予測濃度推移の方が低かった。

OAT1~4 の中では、唯一 OAT4 が mRNA レベルで胎盤に発現していた。また、OAT4 蛋白の発現は、BBM より BLM に多かった。MCTs に関しては、胎盤組織においては検討したすべてのアイソフォーム、すなわち MCT 1~7 の発現が、BeWo 細胞においては MCT1, 3, 5, 6, 及び 7 の発現が mRNA レベルで確認された。OATPs に関しては、胎盤組織及び単離トロホプラスト細胞のいずれにおいても、主に OATP-B, D, E, PGT (prostaglandin transporter) が mRNA レベルで発現していた。これに対して、BeWo, JAR, JEG-3 細胞においては、OATP-B, D の発現は弱く、OATP-E の発現が優位であったほか、胎盤組織や単離トロホプラストでは発現が見られなかった OATP-A が強く発現していた。

ヒト胎盤からサイトトロホプラスト細胞を収率良く単離することができた。単離したトロホプラスト細胞は、3日から4日の培養により、細胞の融合が観察された。培養4日目における OATPs の典型的基質である estrone-3-sulfate の取り込みは、濃度依存的で飽和性を示し、Km 値は 1.71 μM で

あった。SNP 存在下で培養したところ、培養8日目まで細胞の融合は観察されなかったが、細胞の増殖もみられなくなった。EGF および SB203580 を同時に加えた条件下で培養したところ、細胞の融合が見られず、培養日数の経過に伴って細胞が増殖した。しかし、経細胞輸送を評価できる条件、すなわちトランスウェル上に十分な膜抵抗を有する条件で培養を行うことはできなかった。培養に伴う OATPs の発現変動について、2ロットの細胞において検討したところ、OATP-D, E の発現量は、培養6日目まで大きな変化はみられなかったのに対して、PGT, OATP-B については、ロットごとに異なる様式で、培養日数の経過とともに発現量が大きく増加した。

OATP4 の安定発現細胞を用いて輸送特性、阻害剤の影響の検討ならびに、新規基質の探索を行った。その結果、pranlukast が OAT4 の基質となること、angiotensin II receptor 拮抗薬である candesartan, candesartan cilexetil, losartan, losartan carboxyl 及び valsartan が阻害剤となることが明らかとなった。MCTs に関しては、サリチル酸、イブプロフェン、バルプロ酸が、MCT1 を阻害するものの、これらの薬物は、MCT1, MCT4 いずれの基質にもならないことが示された。

D. 考察

胎盤試料を薬物経胎盤透過性の評価に用いる場合には、実験系に応じた適切な提供手順を構築・運用する必要があると考えられた。特に胎盤灌流実験については、娩出後速やかに実験者に提供する必要があり、医療機関と同一敷地内またはごく近隣に実験施設がないと困難と考えられる。また、可能な限り帝王切開による胎盤が望ましいと考えられた。

現在まで、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ただけにとどまっていたが、本研究では、複数の灌流プロトコルの結果に新たに構築した薬物動態学的モデルを適用することで、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。本研究ではさらにこの方法論を用いて、サリチル酸とジクロフェナクの経胎盤移行特性を評価し、モデル解析を行った。灌流液中の蛋白非結合型分率により補正した非結合型としての胎盤組織-母体血漿分配比、及び胎盤組織-胎児血漿分配比は、いずれも

サリチル酸よりジクロフェナクの方が大きく、両薬物の脂溶性を反映していた。しかし、ジクロフェナクの母体側からの非結合型取込クリアランスは、サリチル酸やアンチピリンと比較してほぼ100倍以上と大きく、脂溶性のみでは説明できない可能性もある。また、灌流液中の乳酸によりジクロフェナクの胎盤透過が抑制された。過去に胎盤絨毛癌由来培養細胞において、ジクロフェナクがプロトン依存的な乳酸の取り込みを阻害することも知られている。したがって、ジクロフェナクの胎児移行は、乳酸によって阻害される何らかの輸送系を介していると考えられた。

続いて、ヒト胎盤灌流実験系により得られたパラメータと、妊娠ラットを用いた薬物動態試験及び胎児毒性試験の結果を統合して解析することにより、妊婦が薬物を使用した際の胎児毒性の経時的プロファイルを定量的に予測できる可能性が示された。

胎盤には、有機アニオンを輸送すると考えられている多くの薬物輸送担体の発現が確認された。今回の検討では、単一の輸送担体によって胎児移行が制御されているような例は見出されなかったが、多くの薬物が多くの輸送担体の基質や阻害剤となる可能性は示された。薬物の経胎盤透過における各種輸送担体の寄与を明らかにするためには、基質や阻害剤の特性を発現系と胎盤由来単離細胞（又は膜小胞など）と比較していく必要がある。例えば、今回単離トロホプラスト細胞において算出された estrone-3-sulfate 輸送親和定数 $1.71 \mu\text{M}$ は、OATPs および OAT4 による輸送の親和性とほぼ同程度であった。

また、胎盤透過の評価に頻用されている培養細胞系では、OATPs や MCTs の発現プロファイルがヒト胎盤組織とは異なっていたことから、培養細胞を用いた評価結果の解釈にあたっては注意が必要であろう。こうした問題点を克服するためには、ヒト胎盤由来細胞を用いることが一つの解決策としてあげられる。今回の研究では、ディッシュ上での単離トロホプラスト細胞の培養条件や細胞増殖、合胞体化の制御条件を見出すことができた。一方、経細胞輸送実験を行うためのトランスウェル上でのコンフルエントな培養条件を見出すことはできなかったが、さらなる条件検討を加えることで、十分な膜抵抗が得られる培養条件を見出すこと不可能ではないだろう。

E. 結論

さまざまなプロトコルによるヒト胎盤の灌流実験とモデル解析の組み合わせにより、薬物の経胎盤移行動態を詳細に評価できることが明らかとなった。そして、既報の *in vitro* 実験結果や動物における実験結果と併せて解析することで、ヒトにおける胎児毒性のプロファイルを定量的に予測できる可能性が示された。

一方、胎盤にはさまざまな輸送担体が発現しており、薬物の経胎盤透過に寄与していると考えられた。特に重要と考えられる数種の輸送担体については、安定発現細胞や外来遺伝子発現系を構築してその特性を解明することができた。ただし、胎盤における薬物輸送における各輸送担体アイソフォームの寄与を詳細に解明するためには、培養細胞を用いると発現プロファイルが異なる可能性があるため、可能な限りヒト胎盤より単離したトロホプラスト細胞や、ヒト胎盤由来の膜小胞を用いることが望ましいと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) F. Yamashita, H. Ohtani, N. Koyabu, F. Ushigome, H. Satoh, H. Murakami, T. Uchiumi, T. Nakamura, M. Kuwano, M. Tsujimoto and Y. Sawada. Inhibitory effects of angiotensin II receptor antagonists and leukotrien receptor antagonists on the transport of human organic anion transporter 4. *J. Pharm. Pharmacol.* 58: 1499-505 (2006)
- 2) K. Shintaku, Y. Arima, Y. Dan, T. Takeda, K. Kogushi, M. Tsujimoto, H. Nagata, S. Satoh, K. Tsukimori, H. Nakano, S. Hori, H. Ohtani and Y. Sawada. Kinetic analysis of the transport of salicylic acid, an NSAID, across human placenta. *Drug Metab. Dispos.*, 35(5): *in press*, 2007 (ePub ahead of Print; 20/Feb/2007)

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.
- 4) 新宅恭平, 辻本雅之, 永田秀昭, 佐藤昌司, 月森清巳, 中野仁雄, 堀里子, 大谷壽一, 大戸茂弘, 澤田康文. ヒト胎盤灌流法を用いたジクロフェナクの胎盤透過性の検討, 第15回日本医療薬学会年会 (岡山, 2005年10月), 講演要旨集 p 284
- 5) 澤田康文, 新宅恭平, 辻本雅之, 永田秀昭, 佐藤昌司, 月森清巳, 中野仁雄, 堀里子, 大谷壽一. NSAIDsによる胎児毒性予測のための医薬品情報の構築—非臨床試験データのPK/PDに基づく解析—. 第9回日本医薬品情報学会総会・学術大会 (京都, 2006年7月), 講演要旨集 p 77
- 6) 大谷壽一, 新宅恭平, 辻本雅之, 永田秀昭, 佐藤昌司, 月森清巳, 中野仁雄, 堀里子, 澤田康文. ヒト胎盤灌流法に基づく各種非ステロイド性消炎鎮痛剤の胎児毒性の予測評価. 第16回日本医療薬学会年会 (金沢, 2006年9月), 講演要旨集 p 546
- 7) 澤田康文. 非臨床・臨床データによる胎児毒性評価と予測. 2006年度東京大学薬学部先端創薬科学講座セミナーコース (東京, 2007年3月)

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

平成18年度
政策創薬総合研究
重点研究報告書(Ⅱ)

平成19年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団
〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル(小伝馬町駅前)4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社