

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
総括研究報告書

ヒト胎盤幹細胞を用いた新規発生毒性評価法の開発

研究代表者 近藤 昌夫 大阪大学大学院薬学研究科・教授

## 研究要旨

化学物質の胎児曝露は血液胎盤関門を介して母体血中の化学物質が胎児血に移行することで生じているものの、未だヒト胎盤関門モデル系の確立すら立ち遅れており、化学物質の胎児曝露評価に資するヒト胎盤関門評価系の開発がヒト発生毒性評価のアンメットニーズとなっている。そこで本研究では、我が国で世界に先駆けて樹立されたヒト胎盤幹細胞(TS細胞)を用い、*in vitro* ヒト胎盤関門モデル系を確立し、化学物質や医薬品のヒト胎盤関門透過評価系として確立することを目的とする。

令和6年度の研究では、コントロールとして用いるヒト絨毛がん細胞由来JEG3細胞と、TS細胞を用いて、それぞれについて単層膜培養系の構築を試みた。JEG3単層膜培養については、 $1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>の細胞密度でポリカーボネート製メンブレンを有するトランズウェルに播種し8日間培養することで、安定的に単層膜が構築できることを見出した。確立した系を用いて各種tight junction (TJ) modulatorsを処理した結果から、JEG3が形成する単層膜ではclaudin3/4及びangulinがTJ形成に寄与していることを明らかにした。TS細胞を用いた単層膜培養系では、トランズウェルの上面に細胞層を形成する場合と下面に細胞層を形成する場合の両者を比較し、上面培養の方が経上皮電気抵抗値が高く、操作性の面でも簡便であることから、上面培養が優れていることを見出した。上面培養で構築したTS細胞由来単層膜の分化効率をsyndecan-1 (SDC1)の免疫蛍光染色で評価した結果、構築した単層膜はほぼ全面がSDC1陽性細胞で覆われており、十分な分化が誘導出来ていることが確認された。

また、*in vitro-in vivo*外挿性評価に向けた予備検討を進め、*in vitro*評価系から得られたデータを用いた*in vivo*外挿性にかかるパラメーターの特定を行った。

以上、本年度の研究によりJEG3細胞及びTS細胞のどちらについても単層膜培養系の構築に成功し、今後の化学物質の胎盤透過性評価に向けた系の構築が完了するとともに、ヒト外挿性に向けたファーマコメトリクス解析も予定通り進捗している。

## 研究分担者

池田賢二・大阪大学大学院薬学研究科・教授

## A. 研究目的

化学物質の胎児曝露は血液胎盤関門を介して母体血中の化学物質が胎児血に移行することで生じているものの、未だヒト胎盤関門モデル系の確立すら立ち遅れており、化学物質の胎児曝露評価に資するヒト胎盤関門評価系の開発がヒト発生毒性評価のアンメットニーズとなっている。化学物質のトキシコキネティクス(TK)解析のOECDガイダンス(OECD/OCDE417)において、「有害性評価の考察として化学物質の胎盤通過による胎児

への曝露の程度」が記載されている。しかしながら、げっ歯類とヒトでは胎盤の構造が異なっており、既存のがん細胞株を使用した胎盤関門モデル系はヒト胎盤の特性(トランスポーター機能やバリア機能等)を反映しておらず、未だ*in vitro*ヒト胎盤関門評価系は「化学品の分類および表示に関する世界調和システム(GHS)」に掲載されていない。

我が国では世界に先駆けてヒト胎盤幹細胞(TS細胞)が樹立されており、ヒト胎盤関門を構成するシンシチオトロホブラスト(ST)細胞への分化能を有していること、ヒト絨毛がん細胞株に比してヒト外挿性に優れていること、RIKENバイオバンクから国内外にTS

細胞株が配布されていること、一般的な試薬・器具を用いた低コストでの評価が可能であること、妊娠マウスを用いたTK解析実験の減少につながることから、TS細胞を用いたヒト胎盤関門モデル系を確立できればin vitroヒト発生毒性試験の国際標準法として規格化できるチャンスがある。そこで本研究では、TS細胞を用いてin vitroヒト胎盤関門モデル系を確立し、化学物質や医薬品のヒト胎盤関門透過評価系として確立することを目的とする。

また、確立したin vitroヒト胎盤透過モデル系を用いた化学物質の透過性解析結果からヒト胎盤での透過性を解析するため、生理学的薬物動態モデル(PBPK)解析ソフトウェアであるSimcyp® Simulator (Certara社)を用いたファーマコメト릭ス解析(化学物質の胎児への曝露量や胎児における体内動態を解析)を実施し、胎盤を介した化学物質の胎児曝露量の推定モデルを構築する予定である。

以上、本研究では、in vitro評価系の開発とファーマコメト릭ス解析手法の開発により、胎児安全性が確保された化学物質の開発による妊婦の安心・安全、我が国の化学物質関連産業に国際競争力を付与への貢献を目指している。

本年度は、ST細胞分化誘導条件の確立等を実施した。

## B. 研究方法

### 1. 細胞培養

ヒト絨毛がんJEG3細胞株はECACCより購入し、10%非働化FBS、1%MEM非必須アミノ酸、2 mM L-グルタミン、1 mM ピルビン酸ナトリウム、1%ペニシリン-ストレプトマイシン(P/S)を含むMEM培地を用い、37度、5% CO<sub>2</sub>下で培養した。ヒト胎盤幹細胞CT27及びCT29はRIKENバイオバンクより購入し、0.15%アルブミン、0.5% P/S、1% ITS-Xサプリメント、1% KnockOut serum replacement (KSR)、200 µM L-アスコルビン酸、0.0125% バルプロ酸、25 ng/mL EGF、2.5 µM Y-27632、5 µM A-83-01、2 µM CHIR99021を含むDMEM/Ham's F-12培地を用い、iMatrixでコーティングした培養容器を用いて、37度、5% CO<sub>2</sub>下で培養した。

### 2. JEG3細胞を用いた単層膜培養

JEG3細胞を $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>、あるいは $1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>の細胞密度で、ポリカーボネート(PC)製メンブレンのトランズウェル(ポアサイズ0.4 µm、24 well、Corning製、cat. 3413)に播種し、37度、5% CO<sub>2</sub>下で培養した。2-3日に1回、経上皮電気抵抗値(TEER)をMillicell ERS-2抵抗値測定システムを用いて測定後、培地交換を行い、培養を継続した。

### 3. JEG3細胞単層膜培養系におけるtight junction (TJ) modulatorsの応答性解析

JEG3細胞を $1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>の細胞密度で、PC製メンブレンのトランズウェルに播種し、37度、5% CO<sub>2</sub>下で培養した。2-3日に1回、TEERをMillicell ERS-2抵抗値測定システムを用いて測定後、培地交換を行い、培養を細胞播種後8日間まで継続した。8日後、TEER値が上昇したことを確認した後、claudin (CLDN) modulatorsであるC-CPE194、C-CPE m19、C-CPE mt、C-CPE YLを30 µg/mLの濃度で、あるいはangulin modulatorsであるangubindin-1、angubindin-1 DE mutantを100 µg/mLの濃度で、トランズウェルの下層に添加し、経時的にTEER値を測定することで、JEG3単層膜培養のTJ modulatorsに対する応答性を評価した。添加から24 hまで経時的にTEER値を測定した後、wash out後のTEER値の回復性を評価するため、TJ modulatorsを除去、新しい培養液でwashを行った後、新しい培養液に培地を変え、さらに24 h培養を継続した。TJ modulators添加から48 h後、TEER値を測定することでTEER値の回復性を評価した。

### 4. JEG3細胞単層膜培養系における小分子の透過性解析

上記B-3.に示す方法と同様の方法でJEG3細胞単層膜培養系を構築し、細胞播種8日後、上記3.に示す方法と同様の方法で各種CLDN modulatorsを処理した。処置後24 hで、下層の培地を新たな培地へと交換し、上層の培地を蛍光分子フルオレセイン(332 Da)あるいはフルオレセイン標識デキストラン(4 kDa, FD-4)を含む培地へと交換し、30 min間蛍光分子を透過させた。蛍光分子を含む培地へと交換した30 min後、トランズウェルを除去し、上層より透過した蛍光分子を含む下層培地を回

収した。下層培地に含まれる蛍光分子の量を、分光蛍光光度計を用いて蛍光強度を測定することで求めた。透過した蛍光分子量を基に、透過係数を計算した。

## 5. TS細胞を用いた単層膜培養

TS細胞の単層膜培養には、トランズウェルとしてad-MED Vitrigel 2 (関東化学、cat. 08364-96)を用いた。トランズウェルを0.2 mg/mL matrigel、0.05 mg/mL fibronectinで1 hコーティングした。CT27及びCT29細胞をPre M培地(0.15%アルブミン、0.5% P/S、1% ITS-X サプリメント、1% KSR、200 µM L-アスコルビン酸、2.5 µM Y-27632、25 ng/mL EGF、20 ng/mL BMP-4、50 ng/mL bFGF、0.1 µg/mL heparin、2 µM CHIR99021、2 µM SB202190を含むDMEM/Ham's F-12培地)で懸濁し、 $1.58 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>の細胞密度で、コーティングしたトランズウェルに播種し、37度、5% CO<sub>2</sub>下で培養した。播種2日後、TEERをMillicell ERS-2抵抗値測定システムを用いて測定後、培地をW-DM培地(0.15%アルブミン、0.5% P/S、1% ITS-X サプリメント、1% KSR、200 µM L-アスコルビン酸、2.5 µM Y-27632、25 ng/mL EGF、20 ng/mL BMP-4、50 ng/mL bFGF、0.1 µg/mL heparin、0.5 µM CHIR99021、2 µM SB202190を含むDMEM/Ham's F-12培地)に交換し、さらに培養を継続した。さらに2日後、TEERをMillicell ERS-2抵抗値測定システムを用いて測定後、培地をS-DM2培地(10%非働化FBS、0.5% P/S、2 µM forskolinを含むDMEM/Ham's F-12培地)に交換し、さらに培養を継続した。その後、経時的にTEER値の測定と新しいS-DM2培地への培地交換を繰り返した。

## 6. Syndecan-1 (SDC1)の免疫蛍光染色によるTS細胞のST細胞への分化度の解析

上記B-5.に示す方法にてトランズウェル上でTS細胞をST細胞へと分化させた。分化後、細胞を4%パラホルムアルデヒドで40 min間固定化した。固定した細胞を0.3% Triton X-100含有PBSで40 min間処理することで、膜透過処理を行った。その後、細胞にSDC1抗体を処理することで免疫染色を行った。SDC1抗体はPE標識抗体として、Miltenyi Biotec社より購入し (cat. 130-119-928)、2% FBS、0.1%

Tween-20を含むPBSで希釈して使用した。SDC1抗体処理は4度で1晩反応させた。翌日、抗体希釈液を除去後PBSでwashし、DAPIにより核を染色した。核染色後washし、蛍光顕微鏡により観察を行った。

## 7. ヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)分泌量の解析

上記B-5.に示す方法にてトランズウェル上でTS細胞をST細胞へと分化させた。各培地交換のタイミングで培養液をトランズウェルの上層及び下層から回収し、以下のELISAに供した。

hCG ELISAには、SinoBiological社より購入したhCG抗体ペアを使用した(cat. SEK10903)。キャプチャー抗体をPBSで0.5 µg/mLに希釈し、ELISA用96 wellプレートに100 µL/wellに加え、4度で1晩静置した。翌日、キャプチャー抗体液を除去し、wash buffer (0.05% Tween-20含有PBS)で3回washした。Wash後、blocking buffer (2% BSA含有wash buffer)を加えて室温で1 h静置することでblockingを行った。Blocking後、blocking液を除去しwash bufferで3回washした。Wash後、dilution buffer (0.1% BSA含有wash buffer)で希釈したサンプルを加えて室温で2 h静置した。サンプル反応後、サンプル液を除去しwash bufferで3回washした。Wash後、検出抗体をdilution bufferで0.1 µg/mLに希釈し、検出抗体希釈液を加えて室温で1 h静置した。1 h後、検出抗体希釈液を除去し、wash bufferで3回washした。Wash後、TMB発色液を加え、遮光して室温で20-30 min間静置し、発色させた。その後2N硫酸を加えて発色反応を停止させ、分光光度計を用いて吸光度を測定した。標品を用いた場合の吸光度より検量線を作成し、サンプルの吸光度よりサンプル中のhCG濃度を算出した。

## 8. ファーマコメトリクス解析

PBPK解析ソフトには、Simcyp® Simulator (Certara社)を用いた。

### (倫理面への配慮)

本研究では株化された培養細胞のみを用いているため、倫理的問題は無い。

## C. 研究結果

### 1. JEG3細胞の単層膜培養系の至適条件の検討

はじめに、JEG3細胞の単層膜培養系の至適条件の検討を行った。JEG3細胞を $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>、あるいは $1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>の細胞密度でPC製メンブレンを有するトランズウェル上に播種し、播種後12日までTEER値の推移を確認した。その結果、いずれの条件においても、播種後7日から8日にかけてTEER値が上昇し、8日から10日までTEER値が安定する傾向にあることを確認した(図1)。10日目以降はTEER値が減少したことから、細胞播種後8日から10日が至適条件と判断した。また2種の播種条件の内、 $1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>の方がTEER値がより安定していたことから、細胞の播種密度としては $1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>が至適であると判断した。

### 2. JEG3 単層膜培養系における TJ modulatorsの応答性評価

次に、見出した至適培養条件において、各種TJ modulatorsの応答性を評価した。ここでTJ modulatorsとしては、主にCLDN3/4への結合が報告されるC-CPE194、C-CPE194と比較しCLDN1/2への結合性が強くなった変異体であるC-CPE m19、CLDN5への結合性を持ち、CLDN1-4への結合性は弱くなった変異体であるC-CPE mt、CLDNへの結合性を喪失した変異体であるC-CPE YL、angulin-1/3に結合活性を持つangubindin-1、angulinへの結合性を喪失した変異体であるangubindin-1 DE mutantを用いた。これらのTJ modulatorsを処理し経時的にTEER値を測定することで、TJ modulatorsへの応答性を評価した。その結果、C-CPE194、C-CPE m19は処理後2 hと早期からTEER値の減少を認め、その減少の程度は同等であった(図2)。C-CPE mtも処理後2-4 hと早期からTEER値の減少を認めたものの、その減少の程度はC-CPE194やC-CPE m19と比較し弱かった(図2)。CLDNへの結合性を喪失したC-CPE YLにおいては、TEER値の有意な変動を認めなかった(図2)。Angulin modulatorであるangubindin-1については、処理後早期にはTEER値の変動は認められなかったものの、24 h後においては有意なTEER値の減少が確認された(図2)。Angulinへの結合性を喪失

したangubindin-1 DE mutantについては、TEER値の有意な変動を認めなかった(図2)。24 h後にwash outしTEER値の回復性を評価した結果、C-CPE194、C-CPE m19は弱いながら回復性を認め、C-CPE mtは回復性を認めた(図2)。一方、angubindin-1についてはwash out後もTEER値の減少傾向を認め、回復性は確認されなかった(図2)。

### 3. JEG3細胞単層膜培養系における小分子の透過性解析

上記によりTJが形成されているJEG3細胞単層膜が形成出来ていることが確認されたため、構築した単層膜の物質漏出性の評価を行った。透過性の評価は、フルオレセイン(332 Da)及びFD-4 (4 kDa)をモデル薬剤として用いた。TJが形成されたJEG3細胞単層膜培養系に対し各種C-CPEsを24 h処理し、その後モデル薬剤の透過性を評価した。その結果、TEER値の変動と呼応するように、C-CPE194及びC-CPE m19の処理ではフルオレセイン(図3)及びFD-4 (図4)の透過性は有意に上昇し、その程度は同等であった。一方でC-CPE mtも同様にフルオレセイン(図3)及びFD-4 (図4)の透過性は有意に上昇したものの、C-CPE194及びC-CPE m19と比較しその程度は弱かった。TEERの変化を示さないC-CPE YLでは、透過性は変化しなかった。また、コントロールであるPBS群における各薬剤の透過係数に着目すると、フルオレセインは約 $1.2 \times 10^{-6}$  cm/s、FD-4は約 $0.4 \times 10^{-6}$  cm/sであり、より高分子量であるFD-4の方が透過性が低いことが分かった。

### 4. TS細胞の単層膜培養系の至適条件の検討

コントロールとして用いるJEG3細胞の単層膜培養系は確立できたことから、次にTS細胞をST細胞へと分化誘導し、単層膜培養系の構築を試みた。B-5.に示す方法にてTS細胞をトランズウェルに播種、ST細胞への分化誘導を試みた結果、day 6にかけてTEER値が上昇することを確認した(図5)。至適条件を検討するため、細胞をトランズウェルの上面に培養する場合と下面に培養する場合とを比較した結果、下面培養の場合の方がTEER値が低く、またday 6以降のTEER値の変動も大きい

ことが確認されたことから、上面培養の方が適していると判断した。上面培養の場合、一部の例外はあるものの、day 6～day 10にかけてTEER値は安定傾向にあることを確認した。

## 5. TS細胞のST細胞への分化度の解析

上面培養の方が適していることが確認されたため、TS細胞を上面培養でST細胞へと分化誘導し、day 6の時点におけるST細胞への分化度を評価した。評価方法としては免疫蛍光染色を用い、ST細胞のマーカーであるSDC1の染色を行うことで評価した。結果として、トランズウェル全体が概ねSDC1陽性の細胞に覆われている様子が観察された(図6)。一方で拡大して観察すると、一部SDC1陽性細胞で覆われていない部分も存在していることが確認された。またCT27とCT29の比較においては、CT29の方がSDC1陽性細胞で覆われている率は高いことが示された。この結果はCT29の方がTEER値が高いことと一致していた。

## 6. hCG分泌量の解析

上記分化条件におけるhCG分泌量を確認するため、上面培養を10日間行い、2日ごとにトランズウェルの上層及び下層から培養液を回収した。回収した培養液中のhCG量はELISAにより定量した。その結果、day 2～day 6まで、TS細胞からST細胞への分化が進むにつれ、hCG分泌量は増加することが確認された(図7)。TEER値の結果から、day 6までTEER値は上昇し、その後は一定値を示していることから、day 6までで分化は完了していると想定されているが、hCG分泌量はそれを裏付けるように、day 6以降は一定値を示した(図7)。一方で、hCG分泌量はCT27とCT29でほぼ同程度の値を示しているが、TEERの結果及びSDC1免疫蛍光染色の結果からはCT29の方が分化効率は高いと示されている。よって、hCG分泌量はST細胞への分化指標としては利用できるものの、分化効率を反映したものではないことが示唆された。

## 7. TS細胞の単層膜培養系の分化条件の検討

SDC1免疫蛍光染色の結果が示すように、現在の分化条件ではST細胞への分化誘導は

出来ているものの、構築された単層膜は全面を完全にST細胞で覆えた培養系では無いと考えられる。そこでSDC1免疫蛍光染色を指標に、SDC1陽性細胞による被覆率がさらに高くなる条件を検討した。研究分担者である池田の検討により、JEG3細胞において、成長因子aFGFとheparinの添加によりヒト胎盤性ラク トーゲン(hPL)の分泌が増加すること、さらにheparinの濃度を上げることでさらにhPLの分泌が増加することが示された。この検討結果を基に、Pre M培地及びW-DM培地にもheparinが含まれていることに着目し、これらの培地中のheparin濃度を現在の0.1  $\mu\text{g/mL}$ から0.5, 1, 5, 10  $\mu\text{g/mL}$ と増加させた条件において、TS細胞のST細胞への分化誘導を行った。しかしSDC1陽性細胞による被覆率に大きな変化は認められなかった。次に、現在の分化誘導条件において強力に分化誘導を行っている因子がS-DM2培地中に含まれるFBSとforskolinであることに着目し、forskolinの濃度を現在の2  $\mu\text{M}$ から4, 10, 20  $\mu\text{M}$ へと増加させた条件において、TS細胞のST細胞への分化誘導を行った。しかしこの場合もSDC1陽性細胞による被覆率に大きな変化は認められなかった。さらに、下面培養の方が細胞が触れる培地量が多いことから分化誘導がよりされやすい可能性を考え、上記のheparin濃度の検討及びforskolin濃度の検討を下面培養の場合においても検討した。しかしいずれの場合もSDC1陽性細胞による被覆率に大きな変化は認められなかった。

## 8. ファーマコメトリクス解析

PBPKモデル解析の予備検討として、妊娠時母体・胎児デジタルツインを構成するファクターを整備し、胎盤栄養膜細胞層最外殻(シンシチオトロホブラスト)層の物質透過能を表現するファクター(CLPDM: 胎盤関門胎児側細胞膜0.04に対する母体側透過度)が*in vitro*評価系で得られる物質透過能を適正に反映できる可能性を見出した(図8)。

## D. 考察

本研究では、まず、コントロールとして用いるJEG3細胞の単層膜培養系の確立を試みた。結果として、 $1 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ の細胞密度でPC製メンブレンを有するトランズウェル

に細胞を播種することで、播種後8日間でTJの形成されたJEG3単層膜が再現性良く得られることを見出した。このJEG3単層膜に各種TJ modulatorsを処理した結果、C-CPE194、C-CPE m19が同程度のTEERの減少、C-CPE mtがそれらよりも少し弱いTEERの減少、angubindin-1が弱いTEERの減少を誘導することを見出した。C-CPE194は主にCLDN3/4に結合すること、C-CPE m19はCLDN3/4への結合活性はC-CPE194と同等を維持しつつ、CLDN1/2への結合活性が増加した変異体である。この点を考慮すると、JEG3単層膜が形成するTJには、少なくともCLDN3/4が関与していると考えられ、CLDN1/2の関与は小さいと考えられる。しかし、現在これらのC-CPEsは30 µg/mLの濃度のみで検討をしており、より低濃度においてはC-CPE194とC-CPE m19で活性の違いがある可能性は残されている。そこで今後、これらの処理濃度を変化させてTJ modulatorsに対する応答性を評価する予定である。また、angubindin-1についても弱いながらも有意なTEERの減少が認められた。このことからJEG3単層膜が形成するTJに、angulin-1あるいはangulin-3が関与していると考えられる。一方でデータベースに登録されている遺伝子発現データの情報を参照すると、JEG3細胞においてangulin-3遺伝子はほとんど発現しておらず、angulin-1遺伝子は発現が認められている。このことから、JEG3単層膜が形成するTJに関与しているのはangulin-1である可能性が高いと考えられる。

TS細胞を用いた検討では、トランズウェルの上面に細胞層を形成する場合と、下面に細胞層を形成する場合とで比較を実施した。結果として、下面に培養する場合と比較し、上面に培養する場合の方がTEERが高値となることが示された。この理由については不明であるが、本事業がヒト胎盤関門モデルとしての標準化を目指している点、また下面培養は煩雑な操作を必要とするために標準化を目指す上では不向きである点を考慮すると、上面培養の方が適していると考えられる。実際、上面培養の場合も下面培養の場合も、SDC1陽性細胞の被覆率に大きな違いは無く、ST細胞への分化効率には影響が無いと考えられる。本研究では、TS細胞のST細胞への分化指

標として、SDC1陽性細胞の被覆率、hCG分泌量の2点を解析した。SDC1陽性細胞の被覆率はTEERの結果を良く反映しており、TEERの高いCT29細胞ほどSDC1陽性細胞の被覆率は高い結果となった。一方でhCG分泌量はST細胞への分化進展に伴い上昇したことから、分化指標としては利用可能であるものの、TEER値やSDC1陽性細胞被覆率の結果を反映しておらず、ST細胞への分化効率は反映していないことが明らかとなった。よって、今後さらに分化条件を検討する場合、TEER値とSDC1陽性細胞被覆率が分化効率の指標となる。一方で胎盤はホルモン分泌器官でもあることから、化学物質や医薬品が胎盤のホルモン分泌能へ影響を及ぼすかを評価する点においては、今回構築したhCG ELISA系は利用可能である。

本事業においては上述の通り、TS細胞由来ヒト胎盤関門モデルを構築し、その標準化を目指すものである。今年度の種々の検討の結果、SDC1陽性細胞被覆率は100%では無いものの、その大部分はSDC1陽性細胞で覆われた胎盤関門モデルを構築することに成功した。さらに構築したCT29由来ヒト胎盤関門モデルのTEER値は約200 Ω・cm<sup>2</sup>と、JEG3単層膜モデルの約170 Ω・cm<sup>2</sup>よりも高値を示しており、JEG3単層膜モデルよりも優れた系であることが示唆される。今後、構築したCT29由来ヒト胎盤関門モデルを用い、各種TJ modulatorsへの応答性の評価、モデル化合物を用いた透過性評価、さらには実際の化学物質や医薬品の透過性評価を進めていく予定である。また、ファーマコメトリクス解析に資するパラメーターについて最適化を行い、in vitro透過性データを基にしたヒト胎児曝露評価法の確立に向けた準備を進めていく予定である。

## E. 結論

今年度はコントロールとして用いるJEG3単層膜培養系の構築とCT29由来ヒト胎盤関門モデルの構築に成功した。JEG3単層膜培養系を用いたTJ modulatorsの解析から、JEG3単層膜では少なくともCLDN3/4、angulinを含むTJが機能した単層膜系が構築できていることが示された。また、ファーマコメトリクス解析にかかるパラメーターを見出した。今後

これらのモデルを活用し、化学物質や医薬品の透過性評価を進めることで、新規発生毒性評価法としての標準化を目指す。

## F. 健康危険情報

該当無し

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Hosono, T.; Niwa, Y.; Kondoh, M. Comparison of product features and clinical trial designs for the DTx products with the indication of insomnia authorized by regulatory authorities. *Ther Innov Regul Sci*, in press.
2. Hara, T.; Sato, Y.; Tanishiro, H.; Tamaki, Y.; Baba, S.; Hirose, E.; Yoshida, B.; Watanabe, K.; Nishikawa, G.; Okuda, D.; Murakami, M.; Niwa, Y.; Kondoh, M. Principles for evaluating the efficacy and safety of ceramic dental implants in Japan. *Ther Innov Regul Sci*, in press.
3. Ishibashi, K.; Kusakabe, T.; Kondoh, M. Current application of the medical device single audit program (MDSAP) as a global regulatory reliance framework for the inspection of medical devices. *Ther Innov Regul Sci*, in press.
4. Tachibana, K.; Sugimura S.; Sakimura, S.; Bai, L.; Aoyama, H.; Takeda, H.; Niwa, Y.; Nagahama, M.; Kondoh, M. Size-selective permeation-enhancing modulation of the tight junction by receptor-binding domains of *Clostridium perfringens* enterotoxin and *Clostridium perfringens* iota-toxin. *Tissue Barriers*, in press.
5. Masuda, K.; Ikeda, K.; Endo, A.; Ishikawa, T.; Matsumoto T. Building vancomycin population pharmacokinetic model for Japanese low birth weight infants in comparing it with previously reported pediatric population pharmacokinetic models. *J Infect Chemother*, in press.
6. Nagase, T.; Shima, N.; Maruhana, N.; Miyazawa, Y.; Yoshino, S.; Sato, J.; Yamada, H.; Shinozaki, K.; Ikeda, K. Analysis and evaluation of factors contributing to the occurrence of immune-related adverse events with immune checkpoint inhibitors. *Pharmazie*, 2024, 79, 163-168.
7. Yoshikai, S.; Ueda, M.; Ikeda, K. Effect of

morphine used to relieve dyspnea due to heart failure on delirium. *J Palliat Med*, 2024, 27, 1184-1190.

### 【行政関連事項】

1. セラミック製歯科用インプラントに係る評価について（令和6年3月18日付医薬機審発0318第3号）
2. サリドマイドおよびサリドマイド誘導体医薬品使用手順（TERMS）第3者評価委員会委員長就任（池田賢二）、2024年12月

### 2. 学会発表

#### 【国内学会発表】

1. 林流星、丹羽祐貴、池田賢二、近藤昌夫、In vitro ヒト胎盤関門モデル（JEG-3単層膜培養系）におけるtight junction modulator 反応性解析、第145年会日本薬学会、福岡、令和7年3月26-29日
2. 奥羽華乃子、加藤美羽、大石美奈子、池田賢二、Human Placental Lactogen (hPL)の推移による胎盤成熟度の指標探索、第145年会日本薬学会、福岡、令和7年3月26-29日

#### 【招待講演】

1. 近藤昌夫、アカデミアにおける健康・医療イノベーション人材育成戦略。第14回日本レギュラトリーサイエンス学会、東京、令和6年9月13日
2. 近藤昌夫、GS1を利用した医療機器の情報共有による医療イノベーションの現状・課題・展望。第39回ライフサポート学会大会・第23回日本生活支援工学会大会・日本機械学会福祉工学シンポジウム2024、東京、令和6年9月12日
3. 池田賢二、血中濃度検査について考える：抗菌薬TDM-QCの実際。第64回日本臨床化学会年次学術集会、宇都宮、令和6年8月30日
4. 池田賢二、2023年度感染症治療薬TDMコントロールサーベイ報告。第9回 TDM-QC研究会、川崎、令和6年8月3日

## H. 知的財産権の出願・登録状況 （予定を含む）

**1. 特許取得**

該当無し

該当無し

**2. 実用新案登録**

**3.その他**

該当無し



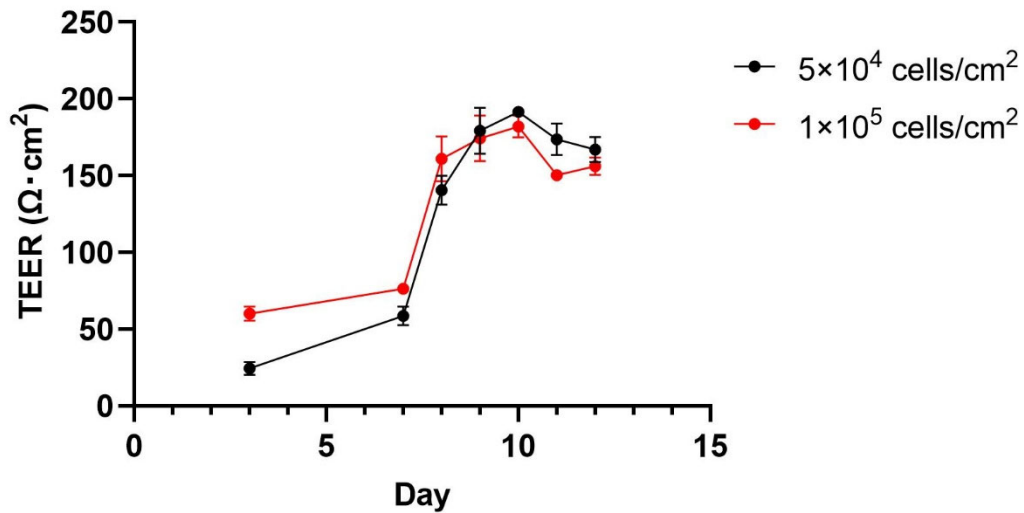


図1 JEG3細胞の単層膜培養系の至適条件の検討

JEG3細胞をPC製メンブレンを有するトランズウェル上に $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>、あるいは $1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>の細胞密度で播種し、経時的にTEER値の測定を行った。Data are presented as means  $\pm$  SEM. n = 5.

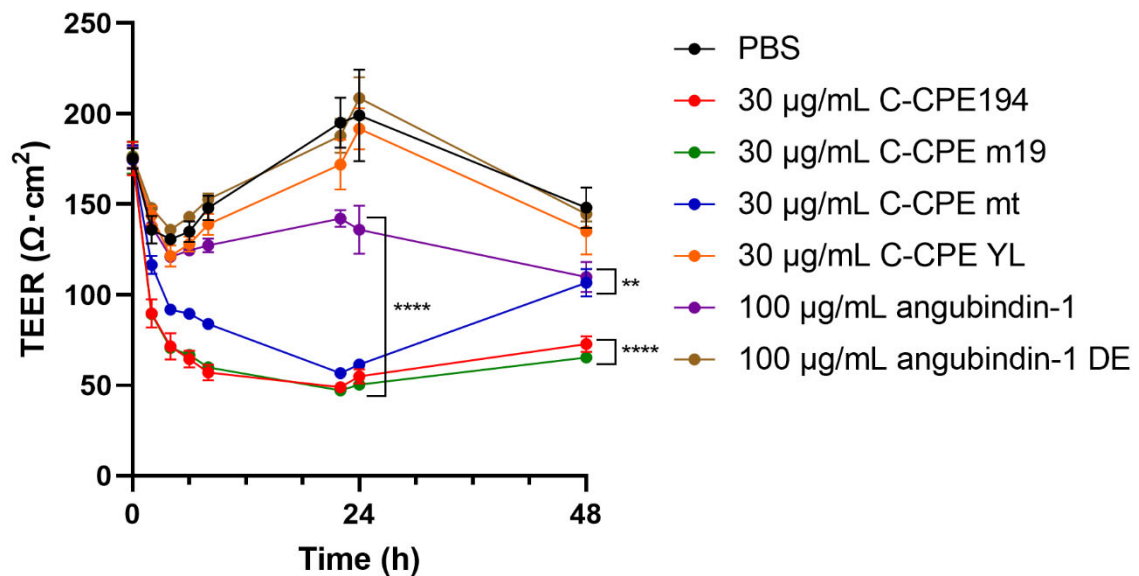
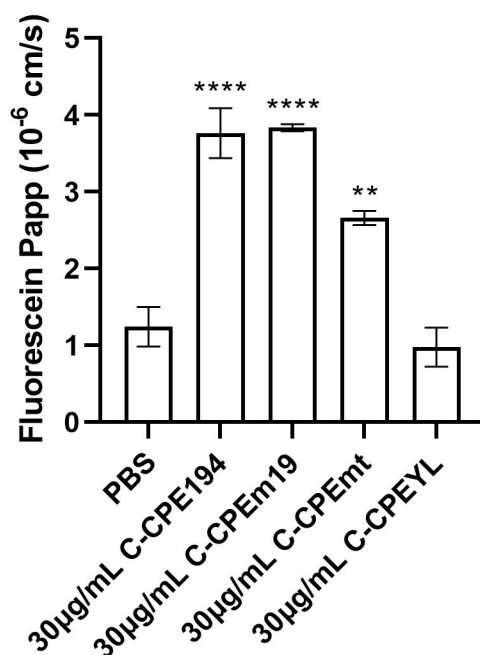


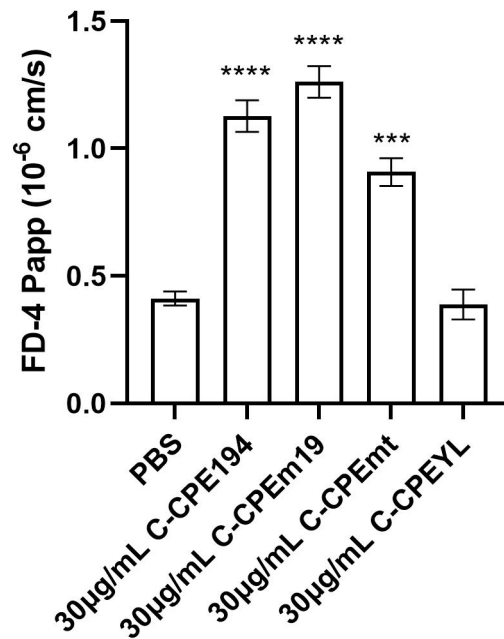
図2 JEG3単層膜培養系におけるTJ modulatorsの応答性

JEG3細胞をPC製メンブレンを有するトランズウェル上に $1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>の細胞密度で播種し、8日間培養した。8日後、各種TJ modulatorsをトランズウェルの下層に添加し、その後経時的にTEER値を測定した。TJ modulators添加24 h後、TJ modulatorsをwash outし新たな培地に交換した後、さらに24 h培養した。試験開始から48 h後、TEER値を測定し、TEERの回復性を評価した。Data are presented as means  $\pm$  SEM. n = 4. \*\*p<0.01, \*\*\*\*p<0.0001 vs PBS by two-way repeated measured ANOVA with Dunnett's multiple comparison test.



**図3 JEG3細胞単層膜培養系におけるフルオレセインの透過性評価**

JEG3細胞をPC製メンブレンを有するトランズウェル上に $1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>の細胞密度で播種し、8日間培養した。8日後、各種TJ modulatorsをトランズウェルの下層に添加し、さらに24 h培養した。24 h後、下層の培地を新しい培地に交換し、上層にフルオレセインを添加した。30 min透過させた後、下層に透過した蛍光物質の量を分光蛍光光度計を用いて測定し、透過係数を算出した。Data are presented as means  $\pm$  SEM. n = 4. \*\*p<0.01, \*\*\*\*p<0.0001 vs PBS by one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test.



**図4 JEG3細胞単層膜培養系におけるFD-4の透過性評価**

JEG3細胞をPC製メンブレンを有するトランズウェル上に $1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>の細胞密度で播種し、8日間培養した。8日後、各種TJ modulatorsをトランズウェルの下層に添加し、さらに24 h培養した。24 h後、下層の培地を新しい培地に交換し、上層にFD-4を添加した。30 min透過させた後、下層に透過した蛍光物質の量を分光蛍光光度計を用いて測定し、透過係数を算出した。Data are presented as means  $\pm$  SEM. n = 3-4. \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001 vs PBS by one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test.

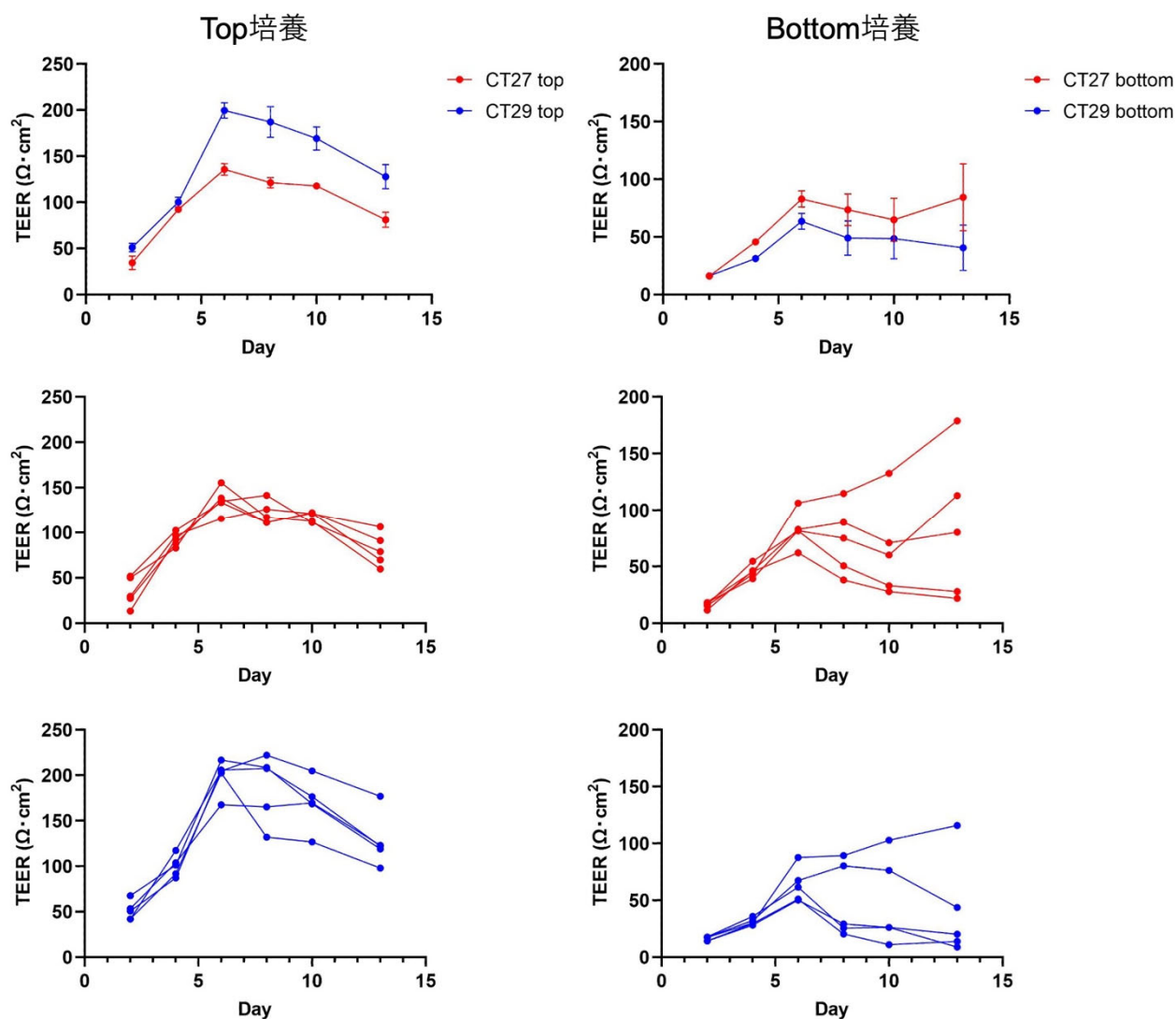
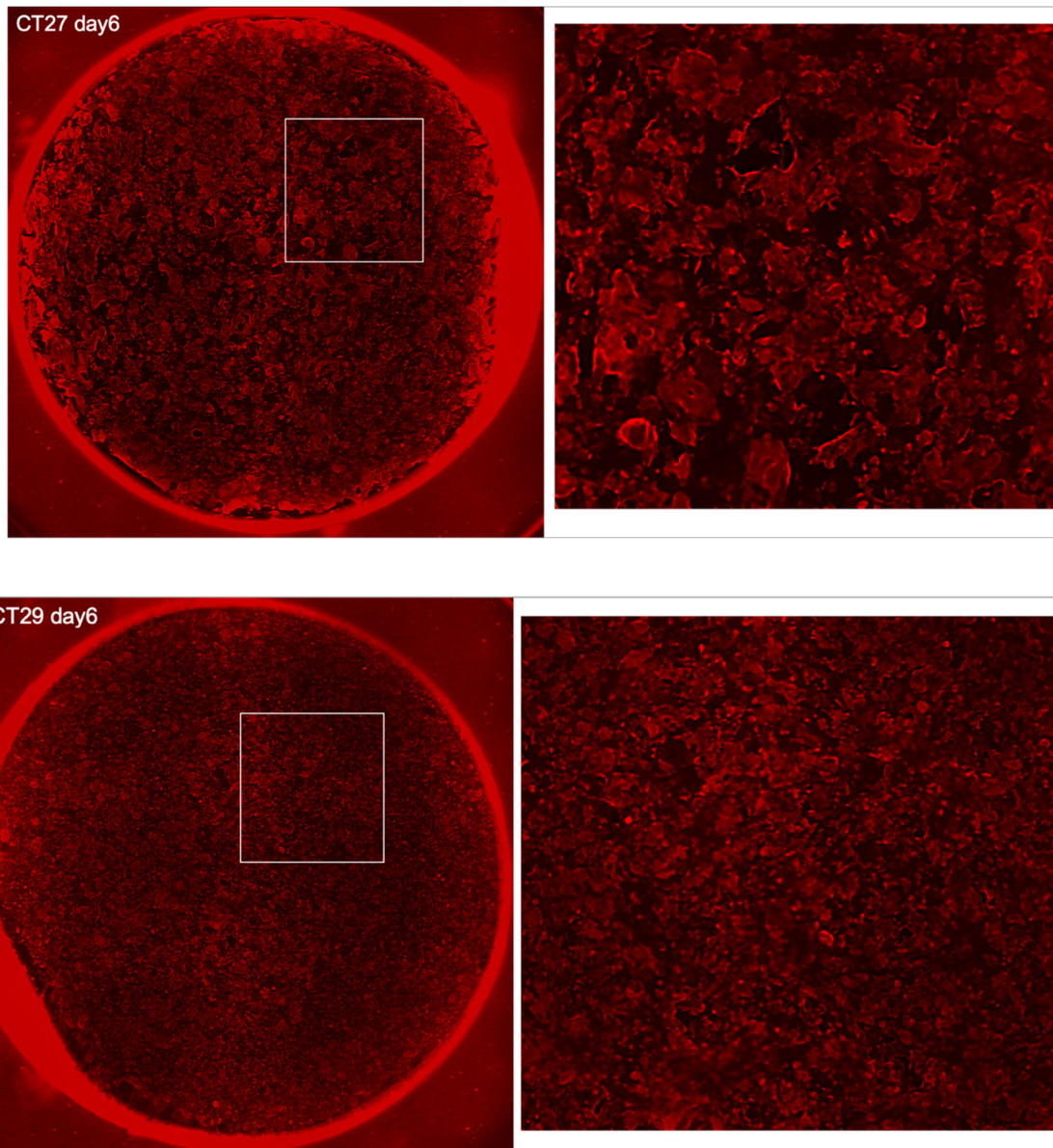


図5 TS細胞の単層膜培養系の至適条件の検討

CT27及びCT29細胞をPre M培地で調整し、matrigel及びfibronectinでコーティングしたVitrigel上に播種した。2日後培地をW-DM培地に交換し、さらに2日後培地をS-DM2培地に交換した。以後2-3日に1回、培地を新しいS-DM2培地に交換した。経時的にTEER値を測定することで、TEER値の変動を確認した。(左)Vitrigelの上面に細胞を播種した場合。(右)Vitrigelの下面に細胞を播種した場合。(上段) Data are presented as means  $\pm$  SEM.  $n = 5$ . (中段) Data of CT27 cells are presented as each replicates. (下段) Data of CT29 cells are presented as each replicates.



**図6 TS細胞のST細胞への分化度の解析**

CT27及びCT29細胞をPre M培地で調整し、matrigel及びfibronectinでコーティングしたVitrigelの上面に播種した。2日後培地をW-DM培地に交換し、さらに2日後培地をS-DM2培地に交換した。播種より6日後、細胞を固定し膜透過処理を行った後、PE標識SDC1抗体を用いてSDC1を染色した。染色したサンプルを蛍光顕微鏡で観察した。(上段)CT27細胞、(下段)CT29細胞、(左)弱拡大、(右)強拡大。

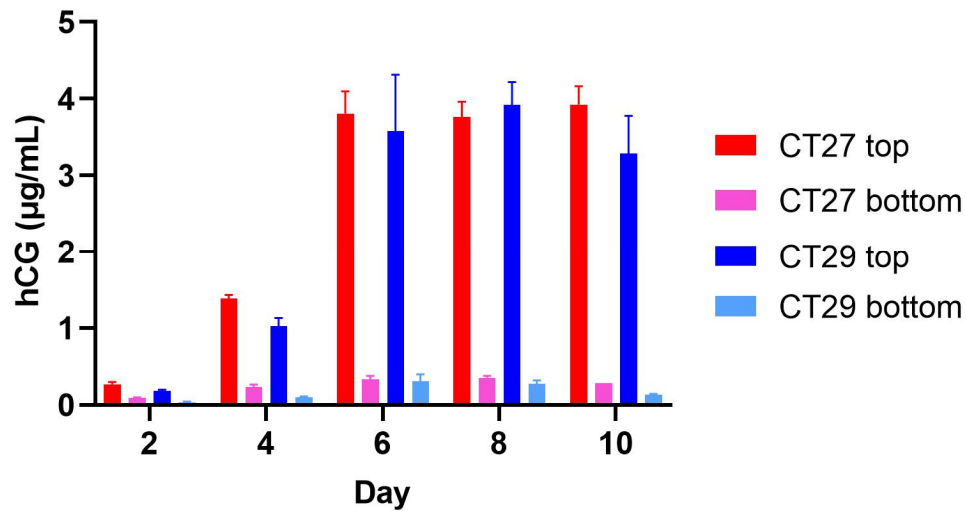
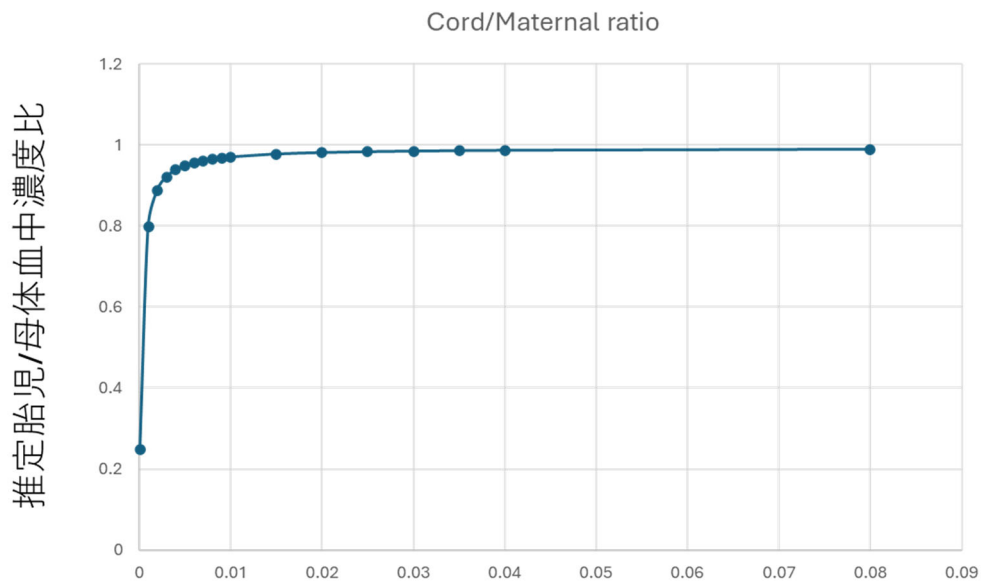


図7 hCG分泌量の解析

CT27及びCT29細胞をPre M培地で調整し、matrigel及びfibronectinでコーティングしたVitrigelの上面に播種した。2日後培地を回収し、W-DM培地に交換した。さらに2日後培地を回収し、S-DM2培地に交換した。その後も2日ごとに培地を回収し、新たなS-DM2培地に培地を交換し、day 10まで培養を継続した。回収した培地中に含まれるhCG量をELISAにより定量した。Data are presented as means  $\pm$  SEM. n = 3.



胎盤関門胎児側細胞膜0.04に対する母体側メトホルミン透過度

### 図8 化学物質の胎児暴露/母体暴露比推定可能性

妊娠時に服用した医薬品の母体・胎児薬物動態推定モデル関連因子として、MP CL<sub>PDM</sub>（母体血中から胎盤細胞への受動的な移行しやすさ）、PF CL<sub>PDF</sub>（胎盤細胞から胎児血中への受動的な移行しやすさ）、Uptake Maternal CL<sub>intMP</sub>（母体血中から胎盤細胞への能動的な付加移行能力）、Efflux Maternal CL<sub>intPF</sub>（胎盤細胞から胎児血中への能動的な付加移行能力）、Uptake Fetal CL<sub>intPF2</sub>（胎児血中胎盤細胞への能動的な付加吸収能力）を設定し、臨床的なデータを有するメトホルミン（妊娠時体内動態データあり）を化学物質モデルとしてパラメーターの変動解析を実施した。