

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7年度の研究では、ヒト絨毛がん細胞由来JEG3細胞とTS細胞を用いて、それぞれについて安定的な胎盤関門モデル系を構築した。構築した各モデルに対し、独自のtight junction (TJ) modulatorsを処理した結果、JEG3が形成する単層膜ではclaudin4及びangulin-1がTJ形成に寄与していることを明らかにした。また、TS細胞由来ST細胞層では、claudin3及びclaudin4がTJ形成に寄与していることを明らかにした。さらに、各モデルにおいて様々な分子量の蛍光分子の透過性を評価した結果から、各モデルではTJが適切に発達しており、各モデルのTJの発達の程度は同等であることを明らかにした。適切な胎盤関門透過評価系が確立できたことから、各モデルにおいて、胎盤透過既知の薬剤であるmetformin、digoxin、sotalol、flecainideの4種の薬剤について、透過性を評価した。結果、薬剤、モデルによって、胎盤透過性が異なることを明らかにした。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胎盤関門モデル系の構築に成功し、化学物質の胎盤透過性評価が適切に実施可能であることを明らかにした。

また、JEG3、CT27、CT29細胞を用いた*in vitro* ヒト胎盤透過モデル系で得られた透過性係数(Papp)を生理学的動態(PBPK)モデルに組み込み、既報の臍帯血/母体血中濃度比(F/M比)との比較検証を進めた。さらに、化学物質の多様な化学的性質を反映し得る*in vitro* ヒト胎盤透過モデル系の妥当性評価を目指し、BCS分類に着目した次段階の対象薬物の選定を行った。

次年度、さらに化学物質の透過性評価を推進することで、今回開発した*in vitro* ヒト胎盤関門モデル系の相違点を明らかにしていくとともに、*in vitro-in vivo* 外挿性評価系の構築を進め、化学物質の胎盤透過性評価系としての有用性を示していく。

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、ヒト生殖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* ヒト生殖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リクス解析(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リク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、昨年度確立したST細胞分化誘導条件等を用いて、*in vitro* ヒト胎盤関門モデル系の構築を行うとともに、*in vitro-in vivo* 外挿性評価系開発の準備を行った。

。

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% CO₂ 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% CO₂ 下で培養した。

2. JEG3細胞を用いた単層膜培養

JEG3細胞を 1×10^5 cells/cm²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% CO₂ 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またはMillicell ERS-3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の処理時の物質透過性評価

JEG3細胞を 1×10^5 cells/cm²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% CO₂ 下で培養した。2-3日に1回、TEERをMillicell ERS-2またはMillicell ERS-3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た。添加後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)、フルオレセイン標識デキストラン(4 kDa, FD-4)、FD-10、FD-40、FD-150を含む培地へと交換し、C-CPEs処理時は30 min間、angubindin-1処理時は2 h間、蛍光分子を透過させた。規定時間の蛍光分子透過後、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。

4. TS細胞を用いたトランズウェル培養

TS細胞のトランズウェル培養には、トランズウェルとして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)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 $\mu\text{g/mL}$ heparin、2 μM CHIR99021、2 μM SB202190を含むDMEM/Ham's F-12培地)で懸濁し、 1.5×10^5 cells/cm²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% CO₂ 下で培養した。播種2日後、TEERをMillicell ERS-3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 $\mu\text{g/mL}$ 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-3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2日間培養を継続した。合計で6日間培養することで、TS細胞をST細胞へと分化させた。

5. TS細胞由来ST細胞層における TJ modulators応答性評価

上記B-4.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、TEERをMillicell ERS-3抵抗値測定システムを用いて測定し、CLDN modulatorsであるC-CPE194、C-CPE m19、C-CPE mt、C-CPE YLを30 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で、トランズウェルの下層に添加した。C-CPEs添加後、経時的にTEERを測定した。添加24 h後、培地を除去、新たな培地でwash後、さらに新たなS-DM2培地にしてさらに24 h TEERの回復性を評価した。

6. TS細胞由来ST細胞層における TJ modulatorsの処理時の物質透過性評価

上記B-4.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、TEER値が上昇したことを確認した後、CLDN modulatorsであるC-CPE194、C-CPE m19、C-

CPE mt、C-CPE YLを30 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で、トランズウェルの下層に添加した。添加後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)、FD-10、FD-150を含む培地へと交換し、30 min間蛍光分子を透過させた。規定時間の蛍光分子透過後、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。

7. Metforminの透過性評価

上記B-2.及びB-4.に示す方法にて、トランズウェル上でJEG3単層膜培養系の構築、TS細胞由来ST細胞層の構築を行なった。各系に対し、metforminを20 μM の濃度で処理し、JEG3では15 min, 30 min, 1 h, 2 h、TS細胞由来ST細胞層では2 h, 6 h, 18 h, 24 h、metforminを透過させた。Metforminの透過した下層の培地を回収し、LC-MS/MSを用いて下層培地中に含まれるmetforminの濃度を定量した。この結果を基に、透過係数を計算した。

8. Digoxinの透過性評価

上記B-2.及びB-4.に示す方法にて、トランズウェル上でJEG3単層膜培養系の構築、TS細胞由来ST細胞層の構築を行なった。各系に対し、digoxinを7 nMの濃度で処理し、30 min, 1 h, 2 h, 4 h透過させた。Digoxinの透過した下層の培地を回収し、ELISAを用いて下層培地中に含まれるdigoxinの濃度を定量した。この結果を基に、透過係数を計算した。

9. Sotalolの透過性評価

上記B-2.及びB-4.に示す方法にて、トランズウェル上でJEG3単層膜培養系の構築、TS細胞由来ST細胞層の構築を行なった。各系に対し、sotalolを6 μM の濃度で処理し、30 min, 1 h, 2 h, 4 h透過させた。Sotalolの透過した下層の培地を回収し、LC-MS/MSを用いて下層培地中に含まれるsotalolの濃度を定量した。この結果を基に、透過係数を計算した。

10. Flecainideの透過性評価

上記B-2.及びB-4.に示す方法にて、トラン

ズウェル上でJEG3単層膜培養系の構築、TS細胞由来ST細胞層の構築を行なった。各系に対し、flecainideを0.7 μ Mの濃度で処理し、30 min, 1 h, 2 h, 4 h透過させた。flecainideの透過した下層の培地を回収し、LC-MS/MSを用いて下層培地中に含まれるflecainideの濃度を定量した。この結果を基に、透過係数を計算した。

11. PBPK解析

メトホルミン、ジゴキシン、ソタロール、フレカイニドについては、既報のPBPKモデルを基に再構築を行った。構築した薬物モデルは、健康成人を対象とした臨床試験データを比較対象とし、各臨床試験と同一条件でシミュレーションを実施した。得られたPKパラメータ(AUC, Cmax, Tmax)を既報値と比較することで、薬物モデルの適合性を検証した。次に、JEG3、CT27、CT29細胞を用いたin vitro ヒト胎盤透過モデル系で得られた透過性係数(Papp)について、胎盤表面積を乗ずることで胎盤透過性クリアランスへ変換し、Simcyp™ Simulator (Certara社)に導入した。また、比較対象として、ex vivoヒト胎盤灌流試験およびCaco-2細胞透過性試験から得られたPappについても同様にパラメータ変換を行い、参照データとして使用した。各薬物について、JEG3、CT27、CT29由来のパラメータ、並びに参照データを用いて推測されたF/M比を比較した。なお、PBPK解析ソフトには、Simcyp™ Simulator Ver.24(Certara社)を使用した。

(倫理面への配慮)

本研究では株化された培養細胞を用い、シミュレーションを実施しているため、倫理的問題は無い。

C. 研究結果

1. JEG3細胞単層膜培養系における TJ modulatorsの処理時の物質透過性評価

昨年度の検討により、JEG3細胞単層膜培養系の至適条件は確定している。また各種TJ modulatorsへの応答性を評価しており、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TEER評価を完了していた。結果として、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1)。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1)。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1)。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1)。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1)。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1)。Angubindin-1についてもwash out後、TEER値の回復性を確認した(図1)。

そこで本年度は、これらを処理時の物質透過性評価を実施した。透過性の評価は、フルオレセイン(332 Da)、FD-4 (4 kDa)、FD-10 (10 kDa)、FD-40 (40 kDa)、FD-150 (150 kDa)を用い、低分子から抗体等の大きなタンパク質まで、幅広い分子量のモデル薬剤として用いた。

まず、C-CPEs処理時の物質透過性を評価した。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、各種蛍光分子の透過性は有意に上昇し、その程度は同等であった(図2)。一方でC-CPE mtも同様に各種蛍光分子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(図2)。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(図2)。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 1.2×10^{-6} cm/s、FD-4は約 0.4×10^{-6} cm/s、FD-10は約 0.2×10^{-6} cm/s、FD-40は約 0.13×10^{-6} cm/s、FD-150は約 0.04×10^{-6} cm/s

であり、より高分子量になるにつれ透過性が低下することが分かった。

次に、angubindin-1 処理時の物質透過性を評価した。その結果、TEER値の変動と呼応するように、angubindin-1の処理では、各種蛍光分子の透過性は有意に上昇したものの、その亢進の程度はC-CPEsと比較して弱かった(図3)。TEERの変化を示さないangubindin-1 DE mutantでは、透過性は変化しなかった(図3)。

2. TS細胞由来ST細胞層における TJ modulators応答性評価

次に、TS細胞由来ST細胞層モデルを構築した。昨年度の検討により、TS細胞由来ST細胞層モデルの安定的な分化誘導法は確立している。そこで本年度は、本モデルに対し各種TJ modulatorsを処理することで、構築したTS細胞由来ST細胞層モデルにおいてTJが発達しているかを評価した。その結果、C-CPE194、C-CPE m19、C-CPE mtのいずれを処理した場合も、有意なTEER値の減少を認め、その減少の程度は同等であった(図4)。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4)。

3. TS細胞由来ST細胞層における TJ modulatorsの処理時の物質透過性評価

上記の通り、CLDNによるTJの発達したTS細胞由来ST細胞層モデルが構築出来ていることが確認されたため、バリアの程度を評価するため、C-CPEs処理時の物質透過性を評価した。透過性の評価は、フルオレセイン(332 Da)、FD-10(10 kDa)、FD-150(150 kDa)を用い、低分子から抗体等の大きなタンパク質まで、幅広い分子量のモデル薬剤として用いた。その結果、TEER値の変動と呼応するように、C-CPE194、C-CPE m19、C-CPE mtの処理で、各種蛍光分子の透過性は有意に上昇し、その程度は同等であった(図5)。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(図5)。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 1.2×10^{-6} cm/s (CT27)あるいは約 1.6×10^{-6} cm/s (CT29)、FD-10は約 0.3×10^{-6} cm/s (CT27及びCT29)、FD-150は約 0.05×10^{-6} cm/s (CT27及びCT29)であり、より高分子量になるにつれ透過性が低下することが分かつ

た。さらに、この数値はJEG3単層膜培養系とほぼ同等であった。

4. 各モデルにおける metformin、digoxin、sotalol、flecainideの透過性評価

上記の通り、JEG3単層膜培養系及びTS細胞由来ST細胞層のいずれに関しても、TJが機能したバリアモデルが構築できた。そこで、本モデル系を用いて、胎盤透過性既知の薬剤であるmetformin、digoxin、sotalol、flecainideの4種類の薬剤について、各モデルにおける薬剤の透過性を評価した。各細胞、各薬剤に関して2 hでの透過係数を算出した結果、表1に示す通りの結果であった。

5. PBPK解析

メトホルミン、ジゴキシン、ソタロール、フレカイニドについて、JEG3、CT27、CT29由来のパラメータ、並びに参照データを用いて推測されたF/M比を比較した(表2)。培養細胞の透過性試験から算出された胎盤透過性クリアランス (CLPDF/PDM) は、フレカイニドを除いて、参照データと比較して高値を示しており、透過性が高いことが示唆された。この結果を反映して、F/M比も参照データと比較して高値となる傾向が示された。

D. 考察

本研究では、まず、JEG3細胞単層膜培養系及びTS細胞由来ST細胞層モデル系の確立を試みた。いずれのモデル系についても、安定的にTEER値が上昇する系の構築に成功した。本系に対し、独自のTJ modulatorsを処理したところ、JEG3細胞単層膜培養系においては、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。実際にデータベースにおける遺伝子発現を確認したところ、JEG3においてはCLDN1、CLDN2、

CLDN3の遺伝子発現はほとんど認められず、CLDN4の発現のみが高いことが確認された。これらを踏まえると、JEG3単層膜が形成する2細胞性TJはCLDN4が主要な役割を担っていると考えられる。また、angubindin-1についても弱いながら有意な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。同じく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3細胞性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細胞由来ST細胞層モデルにおいては、C-CPE194、C-CPE m19、C-CPE mtのいずれも同程度のTEER減少を誘導した。このことから、TS細胞由来ST細胞層においては、少なくともCLDN3/4が関与していると考えられる。現時点ではpreliminaryな結果であるが、TS細胞由来ST細胞層における遺伝子発現を解析した結果、CLDN1、CLDN2の遺伝子発現はほとんどなく、CLDN3、CLDN4の遺伝子発現が認められた。またタンパク質発現についても確認したところ、同様にCLDN1、CLDN2のタンパク質発現は確認できず、CLDN3、CLDN4のタンパク質発現が認められた。以上のことから、TS細胞由来ST細胞層モデルにおいては、CLDN3及びCLDN4がTJに関与していると考えられる。これらについては、来年度に再現性含めたデータ取得を実施し、最終確定する予定である。

次に、各系のバリアの程度を評価するため、様々な分子量の蛍光分子を用い、物質透過性を評価した。JEG3細胞単層膜培養系及びTS細胞由来ST細胞層モデル系のいずれにおいても、TJ modulatorsによるTEER低下の程度と相関し、様々な分子量の蛍光分子の透過性は亢進した。またベースラインにおける物質透過性の程度は、分子量が大きくなるにつれて低下しており、高分子になる程透過しにくいことが明らかになった。さらに、JEG3細胞単層膜培養系及びTS細胞由来ST細胞層モデル系でベースラインにおける物質透過性の程度を比較したところ、同じ分子量の蛍光分子

ではいずれの系においても同程度の透過性を示しており、このことからJEG3細胞単層膜培養系及びTS細胞由来ST細胞層モデル系におけるバリアの程度は同等であり、TJの発達の程度が同等であることが示唆された。

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、本モデル系を化学物質の物質透過性評価系として標準化を目指すものである。本年度の検討により、TJが発達しバリアが形成されたJEG3細胞単層膜培養系及びTS細胞由来ST細胞層モデル系が構築出来ていることが示されたため、研究計画を前倒しし、胎盤透過既知の薬剤であるmetformin (MW 129)、digoxin (MW 781)、sotalol (MW 272)、flecainide (MW 414)の4種類の薬剤について、これらのモデル系における透過性評価を実施した。その結果として、薬剤ごとにJEG3細胞単層膜培養系及びTS細胞由来ST細胞層モデル系で透過性の程度が異なることが示された。具体的には、metforminの場合はJEG3とTS細胞で同程度の透過性を示している一方で、digoxinはJEG3で顕著に透過性が高く、TS細胞と比較して2~3倍の透過性を示した。FlecainideもJEG3の方が透過性が高いが、その程度はTS細胞と比較して1.2倍程度であった。しかしsotalolでは逆に、TS細胞の方がJEG3よりも透過性が高く、JEG3と比較して2~3倍の透過性を示した。さらに、分子量が比較的近いフルオレセイン (MW 332)の透過係数と比較すると、sotalolはJEG3においてはフルオレセインと同程度の透過係数を示しているものの、それ以外は各種薬剤の方が2~16倍程度高い透過係数を示した。このことから、本研究において確立した評価系においては、単にTJバリアによる物質透過性の制御のみならず、トランスポーター等が積極的に関与することで薬剤の透過性を規定している可能性が示唆された。今後、さらに化学物質の透過性評価を推進することで、今回構築したこれら系の相違点を明らかにしていくとともに、化学物質の胎盤透過性評価系としての有用性を示していく。

メトホルミン、ジゴキシン、ソタロール、フレカイニドを対象とした透過性試験およびPBPKシミュレーションの結果から、in vitroとin vivoにおけるパラメータ間には定量

的な乖離が存在することが明らかとなった。特に、培養細胞を用いた透過性試験から得られたパラメータをそのままPBPKモデルへ適用した場合、胎盤透過性やF/M比が参照データと比較して過大評価される傾向が認められた。

これらの結果は、in vitro系とin vivo環境との間に存在する生理学的条件や発現輸送体の違いが、パラメータの乖離に影響している可能性を示唆している。したがって、in vitroデータとin vivoパラメータとの相関関係を系統的に検討し、培養細胞由来の透過性指標を生体条件へ適切に反映させるための補正手法、すなわち IVIVE に基づく変換式を構築することが重要であると考えられる。

E. 結論

今年度はJEG3細胞単層膜培養系及びTS細胞由来ST細胞層モデル系の確立に成功した。どちらの系も、TJが発達しバリア機能を有する系が構築できた。また研究計画を前倒しして4種類の胎盤透過性既知の薬剤について透過性評価を実施し、薬剤、モデルによって、胎盤透過性が異なることを明らかにした。今後これらのモデルを活用し、さらなる化学物質や医薬品の透過性評価を進めることで、新規発生毒性評価方法としての標準化を目指す。

また、メトホルミン、ジゴキシン、ソタロール、フレカイニドを対象に、培養細胞を用いた透過性試験およびPBPKシミュレーションを組み合わせて胎盤移行性の評価を行った。その結果、in vitro試験から得られた透過性パラメータを直接PBPKモデルへ適用した場合、in vivo参照データとの間に定量的な乖離が生じることが明らかとなった。培養細胞由来の透過性指標を用いて胎盤移行性を定量的に予測するためには、in vitroとin vivoの関係性を考慮したIVIVEに基づく変換式の構築が不可欠であると考えられる。今後は、対象化合物を拡充し、培養細胞を用いた透過性試験データを生体条件へ定量的に外挿するIVIVE手法の確立を目指す。

以上、当初計画を大きく上回る研究成果を得ており、PBPK解析についても前倒しで実施した。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Bai, L.; Sakimura, S.; Niwa, Y.; Mizuguchi, H.; Maeda, S.; Ikemura, K.; Okuda, M.; **Kondoh, M.** An in vitro safety evaluation model for assessing the effects of a chemical drug on the human intestinal barrier integrity using genetically modified Caco-2 cells expressing drug-metabolizing enzymes. *Toxicol Lett*, 410, 113-120 (2025)
2. 木村寧希、**近藤昌夫**、上皮バリアの分子基盤を標的とした創薬イノベーションの螺旋的発展、*生産と技術*、77, 26-30 (2025)
3. Yoshioka, Y.; Nosaka, C.; Ohishi, T.; Nakajima, M.; Ishikawa, Y.; Toyota, T.; Takemae, M.; Kubota, N.; Muramatsu, J.; Tatsuda, D.; **Kondoh, M.**; Onoe, H.; Ando, J.; Kawada, M.; Ojima H.; Simizu, S. Loss of Angulin-1/LSR promotes vasculogenic mimicry and epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *J Biol Chem*, 301, 110635 (2025)
4. Inoue S.; Shirakura, K.; Shirono, A.; Taguchi J.; Ikeda, Y.; Funatsu, R.; Muraoka, K.; Hashimoto, Y.; Tachibana, K.; Hino, N.; Doi, T.; Nonomura, K.; Tsujikawa, K.; Tanaka, S.; Obana, M.; Fujio, Y.; Hosoya, T.; Takeda, H.; **Kondoh, M.**; Okada, Y. Claudin-5-binding small molecules transiently open the blood-brain barrier and enhance brain drug delivery. *J Control Release*, 388, 114314 (2025)
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*, 31, 102580 (2025)
6. Yahara-Hotta, M.; Ogino, T.; Higa, K.; Yamakawa, M.; Shikata, T.; Kanata, Y.; **Ikeda, K.**; Kinoshita, A. Identifying characteristics of patients requiring proactive pharmaceutical interventions in the recovery period and assessing the effect of rehabilitation and drugs: A retrospective study. *J Pharm Health Care Sci*, 11, 29

- (2025)
7. Urakawa, R.; Noi, A.; Kageyama, H.; Ueda, M.; Hashii, Y.; **Ikeda, K.** Association between treatment of childhood cancer and its late effects on gonadal or growth function in childhood cancer survivors: A retrospective observational study. *Cancer Med*, 14, e70805 (2025)
 8. Yahara, M.; Sakamoto, T.; Maeda, K.; Kinoshita, A.; **Ikeda, K.** Evaluation of the efficacy of aromatherapy and complementary yoga on indicators of medication regimen complexity. *BMC Complement Med Ther*, 25, 310 (2025)
 9. Tian, Y.; Mao, X.; Zhou, Y.; Fukuzawa, K.; **Ikeda, K.**; Hatabu, A. Status and influencing factors of OTC medicine use for self-medication in cold and cough: a cross-sectional survey in Japan. *BMC Public Health* 25, 1918 (2025)
 10. Kuzu, T.; Iwashita, Y.; Tachibana, K.; Nishino I.; Niwa, Y.; Uyeda, A.; Matsuo, K.; Nagahama, M.; **Kondoh, M.** Identification of amino acids essential for angulin-1/3 binding of the tricellular tight junction binder, angubindin-1. *FEBS Open Bio*, 16, 116 (2026)
 11. Ishigaki, S.; Nishiyama, K.; Nishikawa, T.; Saku, K.; Washio, T.; Yamagishi, Y.; **Kondoh, M.**; Arafune, T. Development of interoperability system for medical devices and its application to real-time hemodynamic analysis. *Adv Biomed Engineer*, 15, 57-65 (2026)
 12. Hosono, T.; Tsutsumi, R.; Niwa, Y.; **Kondoh, M.** Magnitude of the digital placebo effect and its moderators on generalized anxiety symptoms: Systematic review and meta-analysis. *J Med Internet Res*, 27, e74905 (2025).
 13. 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*, 13, 2459963 (2025).
 14. Takamura, K.; Jinnai, G.; Niwa, Y.; **Kondoh, M.** Overview of the Japanese Rapid Introduction Premium as a drug pricing framework to enhance patient access to innovative drugs. *Health Economic Rev*, 16, 1(2025)
 15. Niwa, Y.; Matsushita, S.; Nakayama, I.; **Kondoh, M.** Targeting claudins in cancer: From bench-side to bedside. *Nat Rev Drug Discov*, in press
- ## 2. 学会発表
- ### 【国内学会発表】
1. 丹羽祐貴、林流星、池田賢二、堀武志、梶弘和、**近藤昌夫**、*In vitro* ヒト胎盤関門モデルにおけるtight junction modulators応答性評価、第41回日本DDS学会学術集会、千葉、令和7年6月17-18日
 2. Pharmacodynamics (PD) シミュレーションを用いた腎機能障害患者におけるフェキソフェナジンの適正投与評価、奥羽華乃子、**池田賢二**、第41回日本TDM学会・学術大会、大阪、令和7年7月26日
 3. 丹羽祐貴、林流星、**近藤昌夫**、新規*in vitro* ヒト胎盤関門モデル構築による生殖発生毒性評価法に関するレギュラトリーサイエンス研究、第15回レギュラトリーサイエンス学会学術大会、東京、令和7年9月5-6日
 4. 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系の構築に向けて～JEG-3単層膜培養系のバリア機能評価～、第11回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム、埼玉、令和7年9月13日
 5. Development and Visualization of a Generalizable Pharmacokinetics Model, Kanoko Okuba, **Kenji Ikeda**, 23rd IATDMCT, Singapore, 令和7年9月24日
- ### 【招待講演】
1. 丹羽祐貴、**近藤昌夫**、医薬品の胎盤関門透過評価系の開発、日本薬学会第146年会、大阪、令和8年3月28日
 2. **近藤昌夫**、薬学部および薬剤師の螺旋的発展 過去、現在、未来、日本薬学会第146年会、大阪、令和8年3月29日
 3. **Masuo Kondoh**, Creation of tight junction binders and their application to drug development ～Claudin-5～, Symposium Guards at the gate: proteins of the tight junction. Berlin, Germany, 令和7年11月

22日（招待講演）

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

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

4. 該当無し

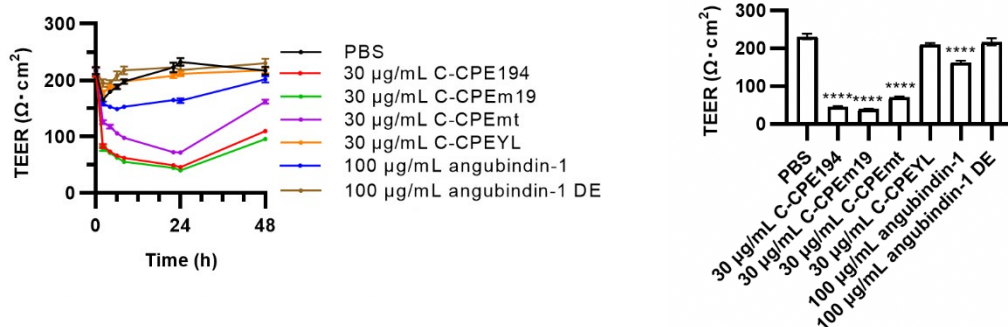


図1 JEG3単層膜培養系におけるTJ modulatorsの応答性

JEG3細胞をPC製メンブレンを有するトランズウェル上に 1×10^5 cells/cm²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 (左)。また24 h時点でのTEER値を示した (右)。Data are presented as means $\pm$ SEM. n = 6. ****p<0.0001 vs PBS by one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test.

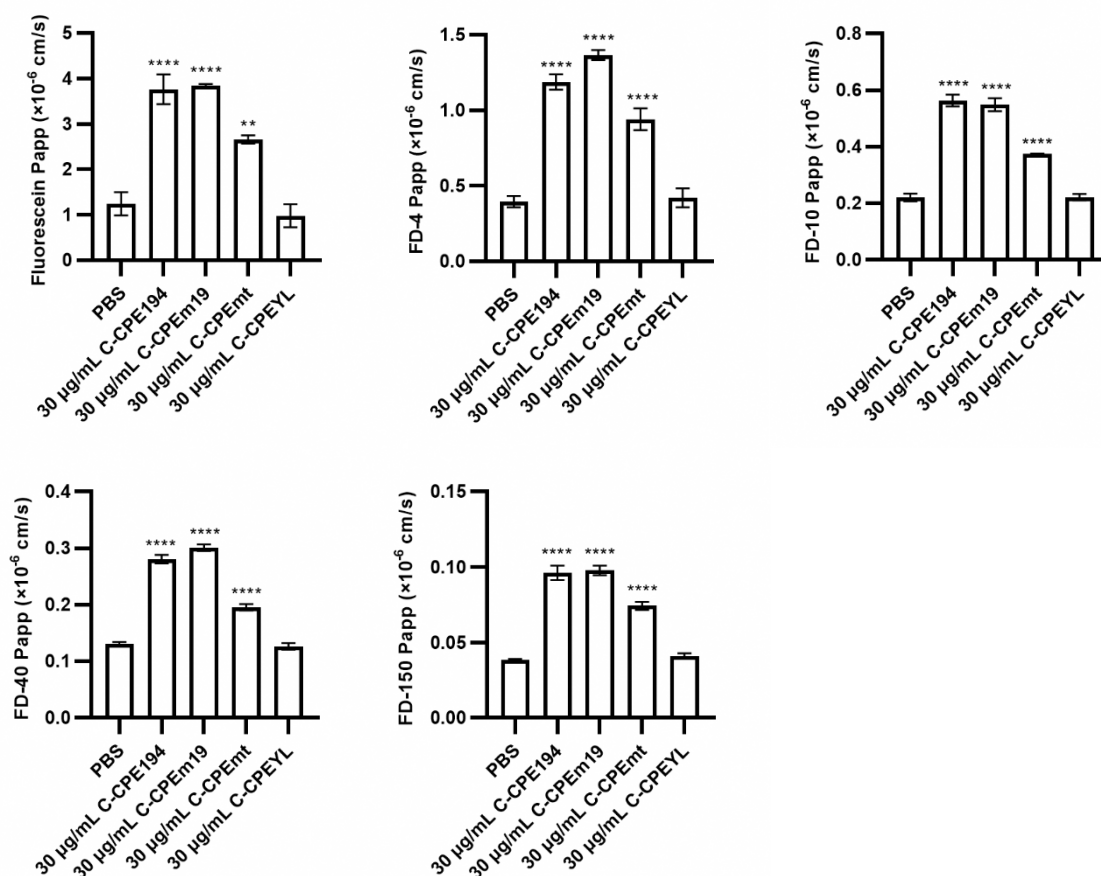


図2 JEG3単層膜培養系におけるC-CPEs処理時の物質透過性

JEG3細胞をPC製メンブレンを有するトランズウェル上に 1×10^5 cells/cm²の細胞密度で播種し、8日間培養した。8日後、各種C-CPEs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、FD-4、FD-10、FD-40、FD-150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.

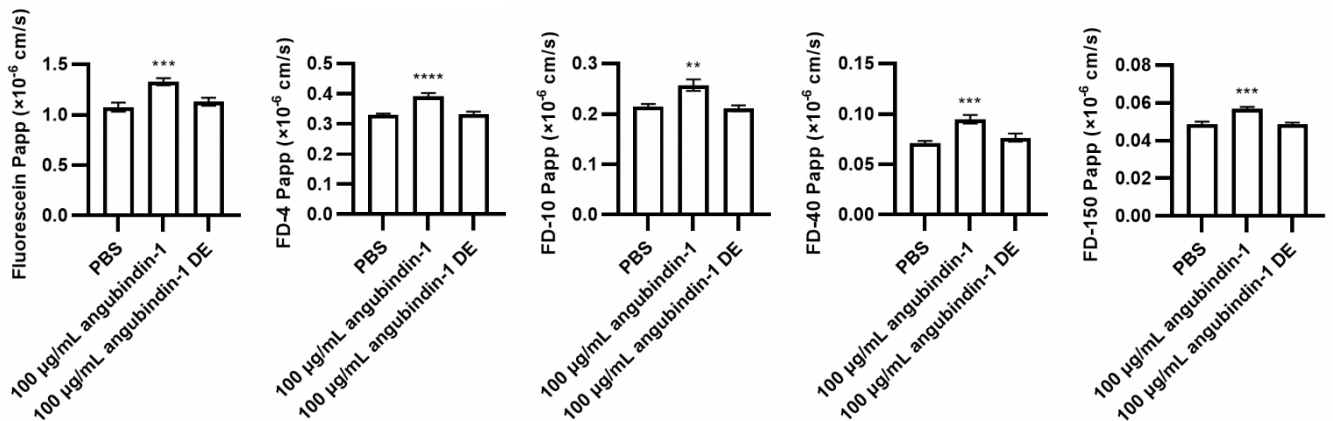


図3 JEG3単層膜培養系におけるangubindin-1処理時の物質透過性

JEG3細胞をPC製メンブレンを有するトランズウェル上に 1×10^5 cells/cm²の細胞密度で播種し、8日間培養した。8日後、各種angubindin-1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、FD-4、FD-10、FD-40、FD-150を添加した。2 h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. $n = 6$. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs PBS by one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test.

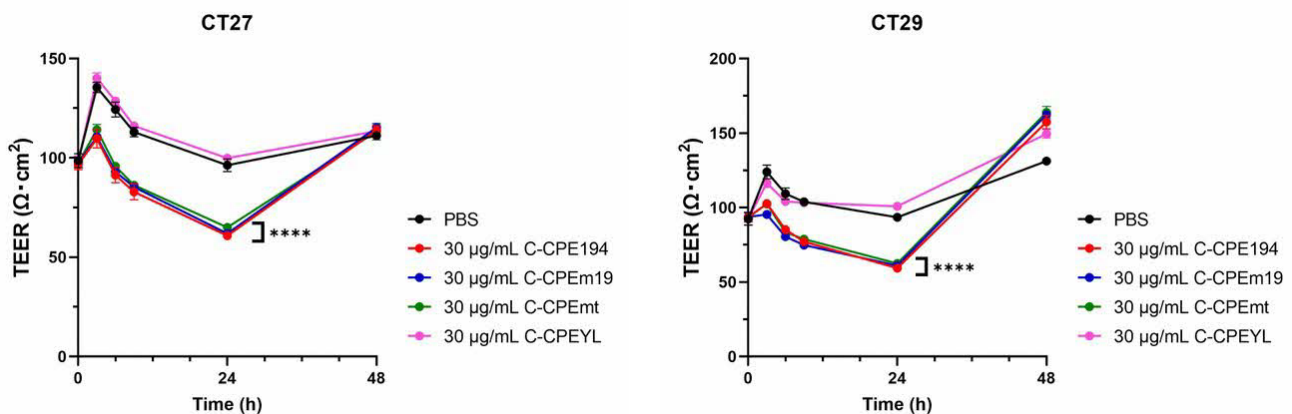


図4 TS細胞由来ST細胞層におけるTJ modulatorsの応答性

CT27及びCT29細胞を、matrigel及びfibronectinでコーティングしたPC製メンブレンを有するトランズウェル上に 1.5×10^5 cells/cm²の細胞密度で播種し、2日ごとに分化培地を変更していくことで、6日間かけて分化させた。6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. $n = 4$. **** $p < 0.0001$ vs PBS by two-way repeated measured ANOVA with Dunnett's multiple comparison test.

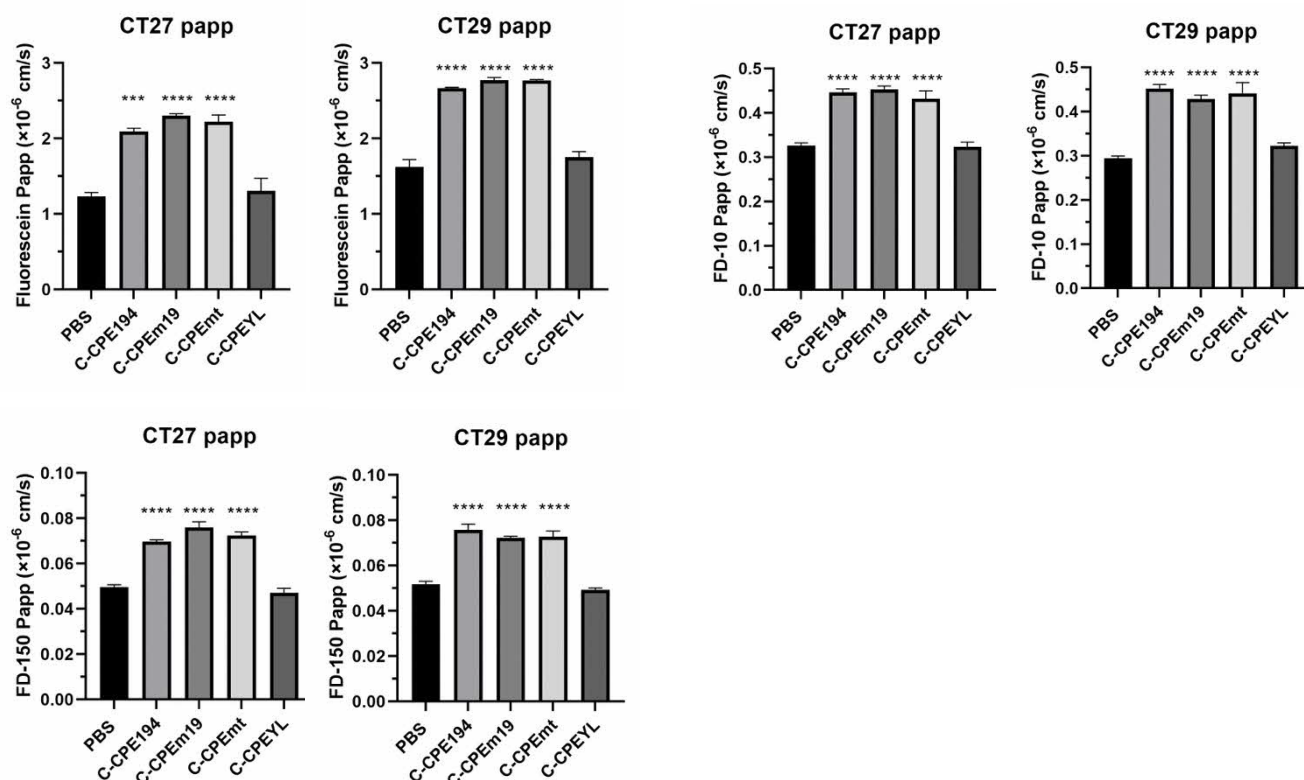


図5 TS細胞由来ST細胞層における物質透過性

CT27及びCT29細胞を、matrigel及びfibronectinでコーティングしたPC製メンブレンを有するトランスウェル上に 1.5×10^5 cells/cm²の細胞密度で播種し、2日ごとに分化培地を変更していくことで、6日間かけて分化させた。6日後、各種TJ modulatorsをトランス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、FD-10、FD-150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<0.001, ****p<0.0001 vs PBS by one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test.

表1 JEG3単層膜培養系及びTS細胞由来ST細胞層における各種薬剤の透過係数 ($\times 10^{-6}$ cm/s)

	Metformin	Digoxin	Sotalol	Flecainide
JEG3	3.99 $\pm$ 0.29	19.7 $\pm$ 11	1.37 $\pm$ 0.36	18.8 $\pm$ 1.9
CT27	4.90 $\pm$ 0.96	5.88 $\pm$ 1.5	2.53 $\pm$ 0	15.0 $\pm$ 2.2
CT29	3.57 $\pm$ 0.27	7.97 $\pm$ 0.48	3.79 $\pm$ 0.55	14.8 $\pm$ 0.83

表 2 臍帯血/母体血血中濃度比（F/M 比）の比較

	Dose		$CL_{PDF/PDM}$	Obs	Pred	Pred/Obs
Metformin Liao et al., 2020	500mg PO BID	ex vivo	0.0006	1.4 ± 0.5	0.85 ± 0.04	0.61
		JEG3	0.00268		0.99 ± 0.00	0.71
		CT27	0.00212		0.98 ± 0.00	0.70
		CT29	0.00235		0.99 ± 0.00	0.71
Digoxin Miyoshi et al., 2019	0.5mg IV, 0.25mg IV, 0.25mg IV, 0.25mg PO	ex vivo	0.00102	0.53 (0-1.0)	0.72 (0.56-0.90)	1.36
		JEG3	0.0222		0.96 (0.93-1.01)	1.81
		CT27	0.00665		0.92 (0.87-1.00)	1.74
		CT29	0.0085		0.93 (0.89-1.00)	1.75
Sotalol Oudijk et al., 2003	160mg PO BID	Caco-2	0.0958	1.11 ± 0.63	1.00 ± 0.00	0.90
		JEG3	0.00157		1.00 ± 0.00	0.90
		CT27	0.00211		1.00 ± 0.00	0.90
		CT29	0.00586		1.00 ± 0.00	0.90
Flecainide Takatsuka et al., 2021	100mg PO BID	Caco-2	0.243	0.695	0.97 ± 0.07	1.40
		JEG3	0.0165		0.96 ± 0.07	1.38
		CT27	0.0445		0.97 ± 0.07	1.40
		CT29	0.0795		0.97 ± 0.07	1.40

Data are presented as mean ± standard deviation or mean (range)

BID twice daily, PO oral administration, Obs observed, Pred predicted, IV intravenous,

$CL_{PDF/PDM}$ clearances on both the maternal-faced (CL_{PDM}) and fetal-faced (CL_{PDF}) sides of the placenta