

|              |   |
|--------------|---|
| Title        | 薬物胎児移行評価系に適うヒト絨毛由来細胞株を用いた胎盤薬物透過モデルの構築に関する研究   |
| Author(s)    | 池田, 賢二  |
| Citation     | 大阪大学, 2012, 博士論文  |
| Version Type | VoR   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/24874">https://hdl.handle.net/11094/24874</a> |
| rights       |   |
| Note         |   |

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【27】

|            |   |
|------------|---|
| 氏名         | いけ だ けん じ<br>池 田 賢 二                                    |
| 博士の専攻分野の名称 | 博 士 (薬学)  |
| 学位記番号      | 第 24999 号   |
| 学位授与年月日    | 平成24年2月24日  |
| 学位授与の要件    | 学位規則第4条第2項該当  |
| 学位論文名      | 薬物胎児移行評価系に適うヒト絨毛由来細胞株を用いた胎盤薬物透過モデルの構築に関する研究             |
| 論文審査委員     | (主査)<br>教 授 中川 晋作<br>(副査)<br>教 授 藤尾 慈 教 授 橋本 均 教 授 堤 康央 |

## 論文内容の要旨

妊娠時の薬物療法は、医薬品の胎児安全性情報に基づいて適正に実施される必要があるが、医薬品の適正使用情報を得るための臨床試験の指針では倫理的配慮のために妊婦は除外対象とされており、現時点でも妊娠時使用におけるヒト胎児安全性が確立されている医薬品は極めて少ない。医薬品のヒト胎児安全性情報は、動物実験での評価やヒトにおける妊娠転帰が判明した後の疫学調査から得られることが多く、これまでのところ正確にかつ迅速に蓄積することが困難であった。近年、人工多能性幹(iPS)細胞を樹立する技術などの発展にともない、より正確かつ迅速にヒト胎児安全性情報を得るために*in vitro*ヒト胎児毒性評価法がいくつか確立されようとしている。ここで、ヒト胎児毒性評価などとともに正確なヒト胎児移行性情報を得ることができれば、ひとつには妊娠時薬物療法における胎児血中濃度を予測することによってより正確な胎児毒性を評価することが可能となる。また実地医療においても、妊娠時薬物療法における同種同効薬の選択などにおいて、母児の利益に大きく繋がると考えられる。しかしながら、現在のところ医薬品の胎児安全性評価項目の中でも、ヒトにおける胎児移行性に言及された医薬品はほとんど無い。そこで本研究では、現在進みつつある医薬品の胎児安全性情報の蓄積を支援する一環として、簡便かつ精度良くヒト医薬品胎児移行性を反映しうる*in vitro*評価系を構築することを考えた。

医薬品の胎児移行を制御する胎盤関門の主要層は、胎盤内絨毛組織の上皮細胞層であるシンシチオトロホプラスト(栄養膜合体)層であることが知られている。シンシチオトロホプラスト層の薬物透過は細胞間隙送経路と細胞膜を直接透過する経細胞輸送経路に大別されるが、一般に上皮細胞層は密着結合(TJ: tight junction)や接着結合(AJ: adherens junction)などによって相互に密に接しており、細胞間隙の物質透過は極めて制限されている。このため、シンシチオトロホプラスト層の主な薬物透過経路は、トランスポーターによる能動輸送を含む経細胞輸送経路であると

考えられる。したがって、*in vitro*胎盤薬物透過評価モデルに用いる細胞層は、細胞間隙透過が抑制されており、シンシチオトロホプラスト層のトランスポーター機能や細胞特性をできる限り反映している必要がある。

以上のような観点から本研究では第一に、胎盤関門モデルに使用しうる細胞株の選択とその培養条件の最適化を行うことによって、細胞間隙透過が抑えられており、経細胞輸送を評価できる可能性のある細胞層の作製に成功した。ヒト絨毛由来BeWo細胞株とJEG-3細胞株を用いて細胞間隙透過性を比較検討し、JEG-3細胞層がBeWo細胞層に比べて有意に細胞間隙透過が抑えられていることが判明した。さらにJEG-3細胞の分化を促す可能性のある各種の培養条件によって作製したJEG-3細胞層の中から、CSC®培地で培養したJEG-3細胞層(DJEG細胞層)モデルが最も強く細胞間隙透過経路を抑えることを見いだした。第二に、シンシチオトロホプラスト様の分化指標を解析することによって、本DJEG細胞層が各種のシンシチオトロホプラスト類似性を維持しており、*in vitro*胎盤関門薬物透過評価モデルとして現段階では経細胞輸送も含めて評価するために最も妥当な細胞層であることを見いだした。シンシチオトロホプラストはサイトトロホプラストから分化して、TJ形成能やAJ関連蛋白であるE-cadherin (ECAD)の発現抑制とcadherin-11 (CAD-11)の発現誘導を伴った細胞融合能の獲得、およびbreast cancer resistance protein (BCRP)をはじめとした胎盤関門に特徴的な排出 (efflux)トランスポーターの機能やhuman chorionic gonadotropin (hCG)などのホルモン分泌機能を獲得する。DJEG細胞においては、シンシチオトロホプラスト様細胞融合能の獲得を示す形態変化とともにECADの発現抑制とわずかながらCAD-11の発現誘導が認められた。また、TJ関連蛋白claudin-1 (CLDN1)の発現誘導やホルモン分泌能、さらにはBCRPの高レベルの発現誘導とeffluxトランスポーター群mRNA発現プロファイルなどのシンシチオトロホプラスト類似性が確認された。これらの結果から、本DJEG細胞層モデルがシンシチオトロホプラスト類似性を有していること、および本モデルにeffluxトランスポーターによる胎盤関門の経細胞輸送を評価できる可能性があることを明らかとした。第三に、これらのシンシチオトロホプラスト様の発現が認められたトランスポーター群が、DJEG細胞層において機能していることを基質薬物の透過性を評価することで検証した。まずBCRPの基質として知られているシメチジンを用いて本DJEG細胞層モデルにおけるBCRPの機能を評価したところ、apical側 (A: 母体側) からbasolateral側 (B: 胎児側)へ (A to B)の透過よりもB to Aの透過が有意に高く、またB to A透過には濃度依存的な飽和性が認められ、本DJEG細胞層モデルがBCRPによる胎盤透過性を反映することを示唆した。また、流入 (influx)トランスポーターにおいてもmonocarboxylate transporter (MCT)の基質薬物であるパルプロ酸の本DJEG細胞層モデル透過性を評価したところ、A to B透過に飽和性が確認されMCTによる担体輸送を反映していることが示唆され、本DJEG細胞層モデルがシンシチオトロホプラストの主なトランスポーター機能を反映していることを確認した。最後に、本DJEG細胞層モデルを用いて、脂溶性や分子量がほぼ同等である3種の睡眠導入剤、プロチゾラム、トリアゾラム、およびゾピクロンの透過性を比較評価したところ、トリアゾラムとゾピクロンの透過性は、それぞれプロチゾラムの1/2、1/10程度と低透過性であることが示された。本結果により、胎盤関門薬物透過が薬物の物性だけでは評価しきれない可能性が示され、*in vitro*胎盤薬物透過モデルによって医薬品の胎児移行性を予測することに大きな意義を見出した。

これら一連の成果により、シンシチオトロホプラストに細胞特性が類似しており、トランスポーターによる担体輸送の評価も含めた経細胞輸送を評価できる*in vitro*胎盤薬物透過評価モデルを構築できたものと考えられた。今後、さらに*in vivo*との相関性を解析していくことで、本DJEG細胞層モデルが薬物胎児移行性評価に適う*in vitro*胎盤薬物透過モデルとして、医薬品の胎児毒性、催奇形性など他の医薬品の胎児安全性情報とともに妊娠時薬物療法のバイオインフォマティクス的一端を担う情報を生み出すことができるものと期待できる。

## 論文審査の結果の要旨

妊娠時の薬物療法における医薬品の胎児安全性情報の蓄積量は、未だ適正な妊娠時薬物療法を行うには不十分である。医薬品のヒト胎児移行性を比較評価できれば、未だ胎児安全性情報の不十分な医薬品であっても、胎児移行性情報に基づいて母体の健康を維持できる投与量を設定できる可能性がある。本研究では、妊娠時の薬物療法における胎児安全性の情報蓄積を支援するため、*in vitro*胎盤薬物透過モデルの構築に着手し、以下の結論を得た。

- 1) JEG-3細胞層は、BeWo細胞層に比べて著しく細胞間隙透過が抑制されており、経細胞輸送を含めた薬物透過性評価において、*in vitro*胎盤薬物透過モデルにより適していることを明らかにした。
- 2) JEG-3細胞をCSC®培地で培養したJEG-3 (DJEG)細胞層は、MEM培養より細胞間隙透過が抑制されており、経細胞輸送を評価可能なレベルの細胞層を形成させることに成功した。
- 3) DJEG細胞層が、胎盤関門の特性として、hCG分泌、hPL、NECC1、BCRPの発現誘導など、いくつか

のシンシチオトロホプラスト化の指標を亢進していることを明らかにした。

4) Effluxトランスポーター群 (BCRP、MDR1、MRPs)のmRNA発現を確認したところ、DJEG細胞層に、シンシチオトロホプラスト様の発現プロファイルが認められ、これらの基質薬物の透過性評価が可能であることを示した。

5) DJEG細胞層において、TJ関連蛋白であるZO-1、OCLN、CLDN1の発現誘導が認められたこと、およびECADの発現減弱とCAD-11の発現誘導をとまなう、細胞融合能獲得傾向が認められたことより、DJEG細胞層は、シンシチオトロホプラスト様のTJ形成能亢進および細胞融合能の獲得によって、細胞間隙透過を抑制していることが示唆された。

6) DJEG細胞層モデルにおいて、BCRP基質シメチジン、MRPsの基質フルオレセイン、およびMCT基質パルプロ酸の透過性評価において、基質薬物のトランスポーター機能特性を反映することが示され、現時点では最も薬物胎児移行評価系に適った*in vitro*胎盤薬物透過モデルを構築できた。

7) 本モデルを用いて、睡眠導入剤、プロチゾラム、トリアゾラム、ゾピクロンの胎盤関門透過性を比較評価した結果、これら脂溶性の類似している薬物間に、顕著な透過性の相違を認め、胎盤関門薬物透過性は、薬物の物性だけで判断できない可能性があることが判明した。また、ゾピクロンは胎盤関門低透過性であること、さらにこれら3種の薬物透過にトランスポーターの競合性があることが示唆された。

以上、薬物胎児移行を評価するためのヒト絨毛由来細胞株を用いた胎盤薬物透過モデルとして、一定の妥当性を持って、本DJEG細胞層モデルがこれに適していることを明らかにした。本DJEG細胞層モデルによる胎盤薬物透過性評価は、経験的な情報に頼らざるを得なかった妊娠時薬物療法における医薬品の選択に、胎児移行性の指標としての新たな判断基準を設けることができる情報となることから、博士(薬学)の学位を授与するにふさわしいものとする。