



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	https://hdl.handle.net/11094/24874
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

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

2011年

池田 賢二

目次

緒論.....	- 1 -
本論.....	- 5 -
第一章 胎盤関門薬物透過モデルに用いるヒト絨毛由来細胞株の選択とその培養条件の探索	- 5 -
第一節 ヒト絨毛由来 BeWo 細胞層と JEG-3 細胞層間における細胞間隙透過性の比較検討	- 5 -
第二節 胎盤薬物透過モデルにおけるヒト絨毛由来細胞株 JEG-3 の至適培養条件の検討.....	- 8 -
第三節 JEG-3 層細胞間隙透過に及ぼすヒト臍帯静脈血管内皮細胞液性因子の影響	- 11 -
第四節 小括.....	- 15 -
第二章 Differentiating JEG-3 (DJEG)細胞の <i>in vivo</i> 類似性解析	- 17 -
第一節 DJEG 細胞層の形態的な <i>in vivo</i> 類似性.....	- 19 -
第二節 DJEG 細胞におけるシンシチオトロホブラスト様分化指標の発現レベル解析	- 22 -
第三節 小括.....	- 30 -
第三章 DJEG 胎盤薬物透過モデルの透過機能解析と有用性の評価	- 33 -
第一節 トランスポーター基質薬物を用いた DJEG 胎盤薬物透過モデルの透過機能解析	- 33 -
第二節 DJEG 胎盤薬物透過モデルによる睡眠導入剤の胎盤関門透過性予測	- 39 -
第三節 小括.....	- 42 -
総括.....	- 45 -
結論.....	- 48 -
謝辞.....	- 49 -
参考文献.....	- 50 -

緒論

1950 年代後半に睡眠導入剤として開発されたサリドマイドは、我が国でも睡眠薬や胃腸薬として販売され、妊娠時のつわり軽減などにも使用されていた。しかしながら、その妊娠初期の使用によるものとされる四肢欠損症児出産の報告が相次いだために販売中止となり、我が国だけでもその認定被害者は 309 例にものぼった。この教訓から、医薬品の催奇形性に対する認識は医療者のみならず妊婦にも広く普及し、妊娠時の薬物療法に対して医療者および妊婦ともに現在も過剰な不安を抱く傾向にある¹⁾。一方、厚生労働省公表の統計資料患者調査では、慢性疾患を患っている妊婦と妊娠時に合併症が誘発された妊婦を合わせた合併症妊娠患者数が、年間 3 万 6 千人を超えていることが示されている。これらの妊婦の多くには、医薬品の胎児安全性情報に基づいた適正な薬物療法が実施される必要があるとともに、十分に妊娠時の医薬品使用についての情報提供を行う必要がある。しかしながら、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、個々の医薬品について報告がなされた各種分野からの胎児安全性情報を纏めているデータベースが既にいくつかあるものの、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。

医薬品の胎児安全性は、催奇形性、胎児毒性、服薬した妊娠時期、胎児移行性などいくつかの評価項目から総合して判断する必要がある(Fig. 1)。我が国の添付文書には、使用上の注意記載要領に「妊婦、産婦、授乳婦、などへの投与」の項があり、主に医薬品の催奇形性や胎児毒性情報に基づいて妊娠時薬物療法における医薬品使用時の注意が記載されているが、「安全性未確立により有益時にのみ投与する」、または「投与しないことが望ましい」と記載される場合が約半数を占めており、十分な胎児安全性情報を得ることは困難である。また、添付文書以外では、虎の門病院の医薬品胎児危険度総合点数算出法がよく知られており²⁾、服薬した妊娠時期を含めて医薬品の催奇形性や胎児毒性に関する情報を評価している。しかしながら、ヒトにおける医薬品の胎児安全性評価は、動物実験での評価を基にしてヒトにおける安全性を予測することや、ヒト



Fig. 1. 妊娠時薬物療法の胎児危険度評価項目と妊娠時期

における妊娠転帰が判明した後の疫学調査に頼るところが大きく、これまでのところ正確にかつ迅速にヒト胎児安全性情報を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、より正確にかつ迅速に医薬品のヒト胎児安全性情報を得ることを目指して、創薬段階から利用しうるいくつかの *in vitro* ヒト胎児毒性評価法が確立されようとしている。ここで、医薬品の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。また疫学的なヒト胎児催奇形性情報などとともに医薬品の胎児移行性情報を組み合わせることで、医薬品に起因する胎児毒性または催奇形性であるのか、または胎盤や母体からの間接的な原因が存在するのかなどが判明していく可能性がある。さらに実地医療においても、*in vitro* 試験によって妊娠時薬物療法に用いられる全ての医薬品のヒト胎児移行性が比較評価されれば、同種同効薬の医薬品選択時にさらに判断基準を設けることが可能となり、妊娠時薬物療法における母児の利益に大きく繋がることは間違いない。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、特に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。そこで著者は、現在進みつつある医薬品の胎児安全性情報の *in vitro* 試験による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。

母体に投与された医薬品は、胎盤を介して胎児へ移行する。胎盤には、母体血と胎児血間で、ガス、栄養分、老廃物などの物質交換を制御している胎盤関門が存在しており、その主な細胞層はシンシチオトロホブラスト(栄養膜合体細胞)層であることが知られている³⁻⁶⁾。Fig. 2 に示すとおり胎盤内は母体血で満たされており、胎児由来の細胞からなる絨毛組織がこの母体血中に浮遊している。母体血と絨毛組織内の胎児血とは、絨毛組織の外壁に存在する上皮細胞層であるトロホブ

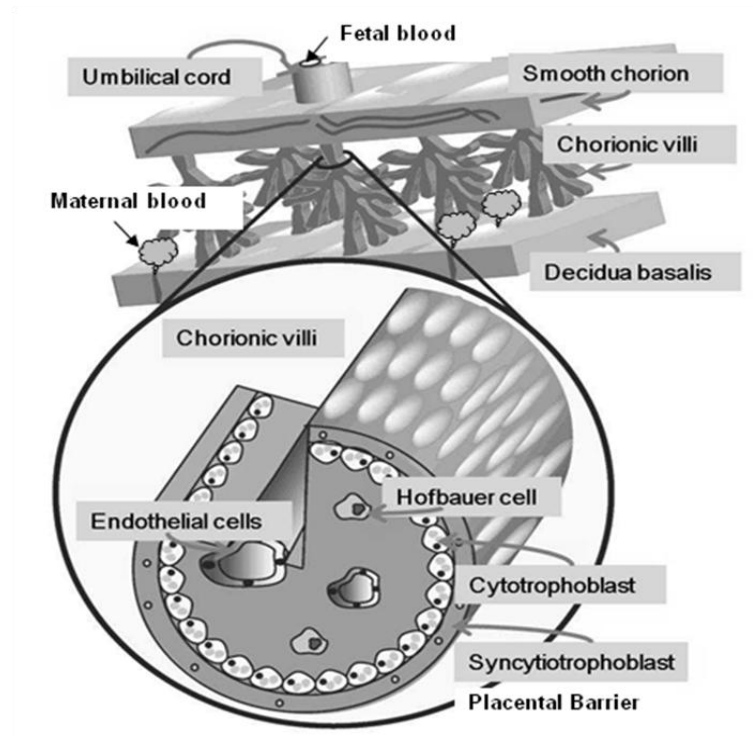


Fig. 2. Overview of the placental membrane.

ラスト(栄養膜)層によって隔てられており、トロホブラスト層はさらに内側のサイトトロホブラスト(栄養膜細胞)層と外側のシンシチオトロホブラスト層から形成されている。シンシチオトロホブラスト層の薬物透過にはいくつかの経路が考えられるが、細胞間隙輸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(Fig. 3)。一般に、上皮細胞は密着結合(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、シンシチオトロホブラスト層の主な薬物透過経路は経細胞輸送経路であると考えられ、トランスポーターによる能動輸送が多くの薬物の重要な透過経路となっている。*In vitro* 胎盤薬物透過評価モデルがヒトにおける医薬品の胎児移行性を反映しうするためには、シンシチオトロホブラスト層の制限された薬物細胞間隙透過、トランスポーターによる薬物輸送、およびできる限りの細胞特性を反映できる細胞層を作製する必要がある。

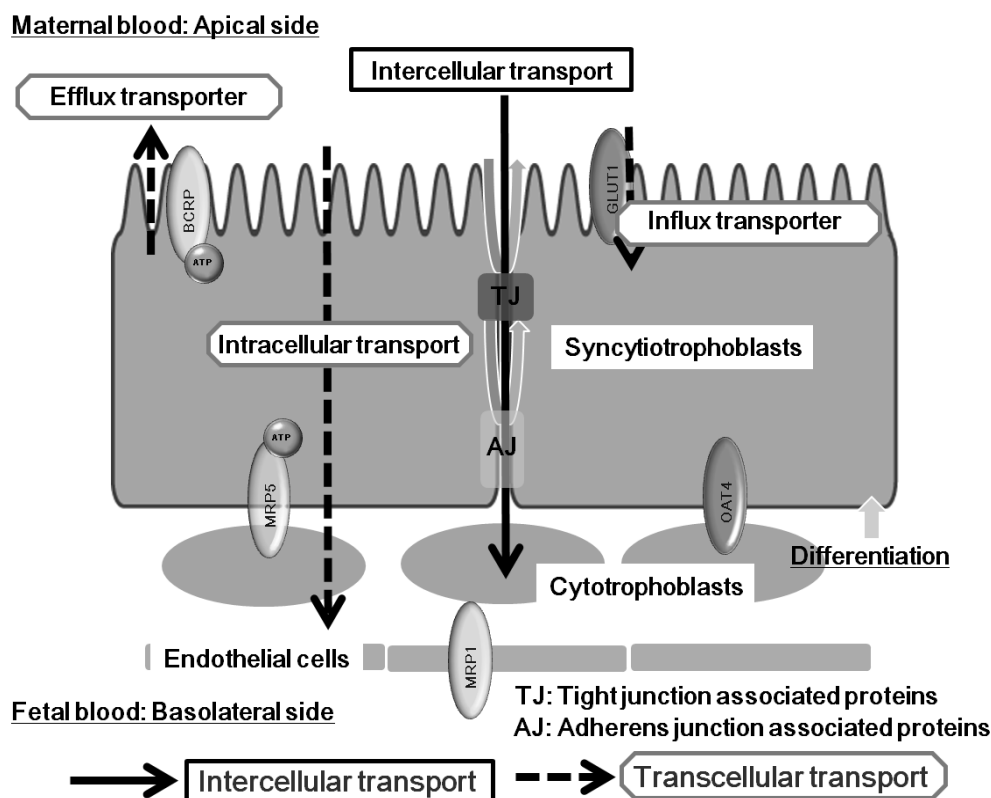


Fig. 3. Overview of the placental barrier.

シンシチオトロホブラスト層に類似した TJ 形成能, 細胞特性, およびトランスポーター機能を有する *in vitro* モデルを構築するために, 本研究ではまず細胞間隙透過をできる限り生体内のレベルに近づけた細胞層を得ることができる細胞株を検討した。次に, よりシンシチオトロホブラスト層に近づけるための培養条件を探索し, 経細胞輸送経路の評価が可能なレベルにまで細胞間隙透過を抑制できるモデル細胞層を作製した。さらには, トランスポーター発現プロファイルを解析することで, 本細胞層モデルがシンシチオトロホブラスト層に類似したトランスポーター機能を反映でき

る可能性を検証した. また同時に, いくつかの指標を用いて本細胞層とシンシチオトロホブラスト層間で細胞特性の類似性を評価した. 最後に, シンシチオトロホブラストに発現している代表的なトランスポーターの基質薬物を用いて本細胞層モデルの透過機能を評価し, 本細胞層モデルが胎盤関門の経細胞輸送を含めた透過機能特性を反映しうることを検証した. これら一連の研究成果として, 薬物の胎児移行を評価するに適う可能性をもった, *in vitro* 胎盤薬物透過評価モデルを構築することができたので, ここに学位論文としてまとめた次第である.

本論

第一章 胎盤関門薬物透過モデルに用いるヒト絨毛由来細胞株の選択とその培養条件の探索

胎盤関門の実体と考えられるシンシチオトロホブラスト層に類似した *in vitro* 胎盤薬物透過評価モデルを構築するためには、適切な細胞株と培養条件の検討がまず必要である。一般に *in vitro* で作製した上皮細胞層モデルは TJ 形成が未熟であり、*in vivo* と比べると細胞間隙輸送経路が大きく寄与してしまっている⁷⁻¹³⁾。これまでに *in vitro* 評価系が確立されている薬物透過評価モデルには、薬物の小腸吸収予測手法としてのヒト大腸がん由来 Caco-2 細胞層モデルや¹⁴⁾、中枢神経系への薬物透過予測手法としての血液脳関門薬物透過評価モデルなどがある¹²⁾。これらの *in vitro* 薬物透過評価系は、いずれも細胞間隙透過経路を *in vivo* に近づけることによって、評価する組織に類似した透過機能特性を反映させた薬物透過評価系である。したがって、*in vitro* 薬物透過モデルの作製においては、モデル細胞層の薬物透過に寄与する細胞間隙透過をできる限り低く抑えることが第一条件である。

本章では、まずモデル細胞層の TJ 形成能を最重要課題とし、より細胞間隙経路の物質透過を抑えることができる細胞株を選択した。さらによりシンシチオトロホブラスト層に近づけるための培養条件を検討することで、経細胞輸送経路の評価が可能なレベルにまで細胞間隙透過を抑制した細胞層を作製することに取り組んだ。

第一節 ヒト絨毛由来 BeWo 細胞層と JEG-3 細胞層間における細胞間隙透過性の比較検討

シンシチオトロホブラストに類似している可能性のある細胞には、ヒト絨毛由来(human chorionic villi-derived) BeWo 細胞株、JEG-3 細胞株、JAR 細胞株などがある。これらの細胞株は、これまでも絨毛組織の子宮内膜への浸潤機構の解明など、トロホブラスト機能の検討に広く用いられてきた。しかしながら、JAR 細胞株は、TJ、AJ 関連蛋白質である zonula occludens-1 (ZO-1)、epithelial-cadherin (ECAD)、などの細胞表面局在性を評価したところ、シンシチオトロホブラスト層との類似性が認められず、少なくとも胎盤関門の物質透過の評価モデルには適していないと報告されている¹⁵⁾。一方、BeWo 細胞および JEG-3 細胞では、薬物の細胞内取り込みや細胞層の物質透過に関する検討がなされてきたが¹⁶⁻²²⁾、これらの胎盤物質透過モデルでは、形成した細胞層の細胞間隙透過が著しく高いため、トランスポーターなどを介した経細胞輸送に基づく薬物透過を正確に評価できなかった²³⁾。したがって、本節ではまず BeWo 細胞と JEG-3 細胞とを用いて細胞層を形成し、細胞間隙透過性を比較検討することでより細胞間隙透過を抑えることができる細胞

株の選択を行なった。

実験材料と方法

(1) セルカルチャーインサート上でのヒト絨毛由来 BeWo 細胞株と JEG-3 細胞株の培養

ヒト絨毛由来 JEG-3 細胞株 (Lot no. 04E018, DS ファーマバイオメディカル) および BeWo 細胞株 (DS ファーマバイオメディカル) は, 10% fetal bovine serum (FBS) を含有した Eagle's minimum essential medium (MEM, ナカライテスク) を用いて, 5% CO₂, 37°C 条件下により維持培養した。ポアサイズ 0.4 μm , 膜面積 0.7 cm^2 の Polyethylene terephthalate (PET) メンブレンを有する 24 ウェルのセルカルチャーインサート, ミリセル[®] (ミリポア) の培養膜を, コラーゲン Type I (新田ゼラチン):60% エタノール(1:3)の 50 μL でコーティングし²⁴⁾, 無菌的に一夜静置乾燥後, これに 50,000 個/ cm^2 の細胞密度で BeWo 細胞と JEG-3 細胞を播種した^{16,18-26)}。ミリセル[®]は, 24 ウェルプレート の 1 ウェル内で静置培養し, ミリセル[®]内の層(400 μL)を上層(apical 側), ミリセル[®]外の層(800 μL)を下層(basolateral 側)とした。ミリセル[®]上で培養後, それぞれの細胞層を 10 日間経日的に経上皮電気抵抗(Trans epithelial electric resistance, TEER)値の測定, および 7 日目に fluorescein isothiocyanate-labeled dextran (w.t. 4400, FD-4)FD-4 の透過実験に供した(Fig. 4)。

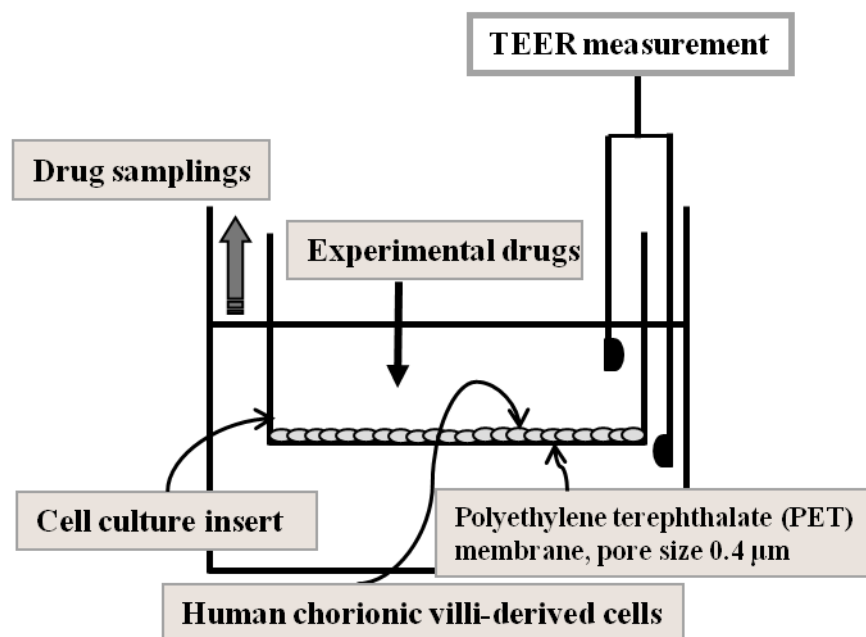


Fig. 4. Diagram of culturing human chorionic villi-derived cell layers.

(2) TEER 値の測定

TEER 値の測定には, ミリセル[®]ERS 装置(ミリポア)を用いた。細胞層を形成した培養膜の上層

と下層に電極を浸し、抵抗値を測定した。同時に、コーティングのみを行った細胞層の無い培養膜の抵抗値(ブランク)も測定し、ブランクを差し引いた抵抗値に膜面積を積算して細胞層の TEER 値 (ohms・cm²)とした。

(3) BeWo 細胞層および JEG-3 細胞層を介した FD-4 の透過実験

BeWo および JEG-3 を用いて、ミリセル[®]上で細胞層を形成した。培養 7 日目に、透過実験緩衝液 4.5 g/L D-グルコース含有 Hank's balanced salt solution (HBSS)で、上層 400 μL, 下層 800 μL の培地を置換し、30 分間インキュベートして細胞層を安定化させた。最終濃度 10 μM の FD-4 を上層に添加し、30, 60, 90 分後にサンプリングを行った。サンプリングは、下層から 10 μL を採取して FD-4 透過量のサンプルとし、採取量と同量の HBSS 10 μL を下層に添加した。採取したサンプル 10 μL を 190 μL の HBSS で希釈した後、FD-4 を蛍光光度計(excitation 485 nm, emission 528 nm)で定量した。また、細胞層を介した見かけの物質透過係数(P_{app} : apparent permeability coefficient)は式 1 より計算した。

$$\text{式 1: } P_{app} = \frac{dQ/dT}{A \times C_0} \quad \begin{array}{l} dQ/dT: \text{ permeation rate (nmol/s), } A: \text{ membrane area (cm}^2\text{), } C_0: \text{ donor side} \\ \text{concentration (}\mu\text{M), } P_{app}: \text{ apparent permeability coefficient (cm/s)} \end{array}$$

実験結果および考察

細胞層の細胞間隙透過性は、ひとつには TEER 値{膜抵抗(ohms)×膜面積(cm²)}とよく逆相関することが報告されている^{12,23,27,28}。まず、JEG-3 細胞層と BeWo 細胞層の TEER 値を比較することによって、細胞間隙透過性がより低い細胞層を得ることができる細胞株を検討した。MEM によって培養した JEG-3 細胞層と BeWo 細胞層の TEER 値は培養 4 日目以降一定となり、培養 7 日目にはそれぞれ約 160 ohms・cm²と約 50 ohms・cm²であった(Fig. 5A)。Liu らの報告においても²³、BeWo 細胞層の TEER 値は最大 60 ohms・cm²程度であり本結果を支持するものであった。また、FD-4 は培養細胞層の細胞間隙経路を主に拡散通過する水溶性分子であり、細胞間隙透過性の評価によく用いられている^{29,30}。FD-4 透過量を経時的に比較したところ、90 分の FD-4 透過量では JEG-3 細胞層の方が BeWo 細胞層に比べて約 10 倍低く、この時の透過係数は JEG-3 の 0.78 x 10⁻⁶ cm/s に対し、BeWo では 7.18 x 10⁻⁶ cm/s であった(Fig. 5B)。これらの結果より、JEG-3 細胞層は BeWo 細胞層と比較して細胞間隙透過性が著しく低いことが判明し、*in vitro* 胎盤薬物透過モデルには JEG-3 細胞を用いる方が適切であることが強く示唆された。

In vitro 薬物透過モデルの TEER 値に関する実例を挙げると、ヒト小腸薬物吸収モデル Caco-2 細胞層は通常 TEER 値 300 ohms・cm² 以上で試験されている。TEER 値 300 ohms・cm² 以下の Caco-2 細胞層では、細胞間隙透過の影響により経細胞輸送を含めた薬物透過を正確に反映で

きないと考えられているためである^{9,10,14,25,29-33}). したがって、胎盤関門薬物透過評価モデルでも TEER 値 $300 \text{ ohms} \cdot \text{cm}^2$ 以上の細胞層を得ることは、経細胞輸送を評価するための参考値となるものと考えられる. 本節で得られた JEG-3 細胞層は, BeWo 細胞層よりは細胞間隙透過性が著しく低かったが, JEG-3 細胞層でも TEER 値は $160 \text{ ohms} \cdot \text{cm}^2$ 程度であり, 未だ薬物透過評価モデルとしては細胞間隙透過経路の寄与が大きいと考えられる.

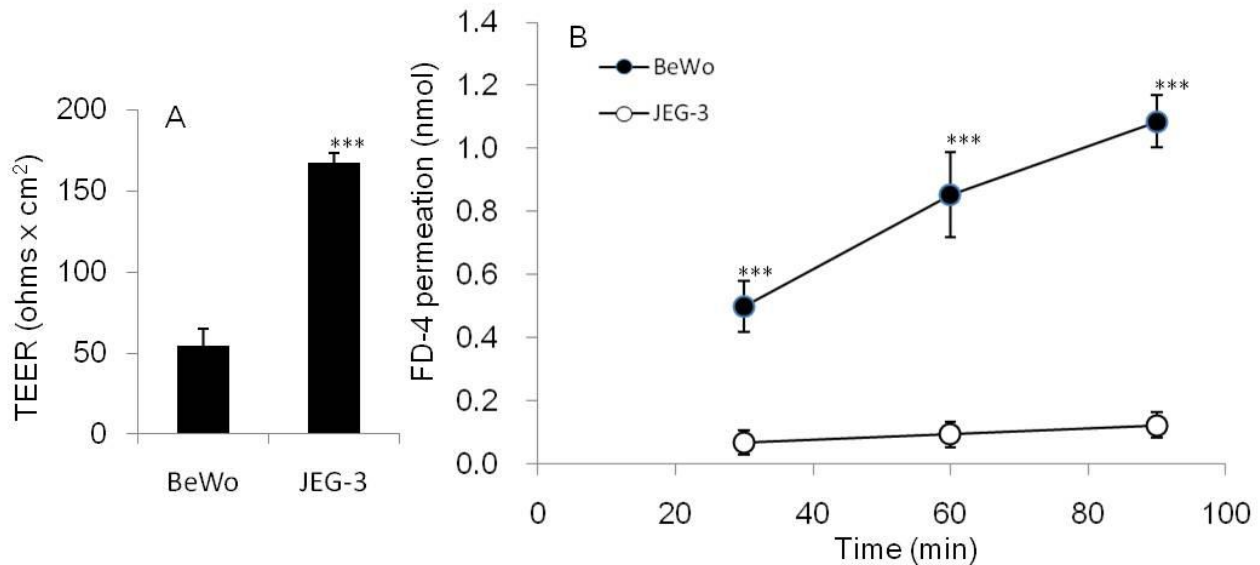


Fig. 5. TEER values (A) and FD-4 permeation time course (B) across BeWo and JEG-3 cell layers. The cells were cultured in each maintenance culture medium for 7 days. *** $p < 0.001$.

第二節 胎盤薬物透過モデルにおけるヒト絨毛由来細胞株 JEG-3 の至適培養条件の検討

前節では JEG-3 細胞層の作製に MEM を用いたが, MEM による JEG-3 細胞の培養では経細胞輸送を精度良く評価できる細胞層を得ることはできないことが明らかとなった. シンシチオトロホブラストは, サイトトロホブラストから分化して胎盤関門の機能を獲得することが知られているが³⁻⁵, JEG-3 細胞はサイトトロホブラスト様である可能性を示唆した報告がある⁵. JEG-3 細胞の分化を促すことができれば, より細胞間隙透過経路を抑えることができ, 胎盤関門様の細胞層を形成させることができる可能性があると考えられる. サイトトロホブラストからシンシチオトロホブラストに分化させる因子に関してはさまざまな報告がなされている³⁴⁻⁴⁰. これらの因子を MEM に添加することおよび培養液を栄養素の豊富なものに変更することで, JEG-3 細胞の分化を促す可能性があると考えられる. まず, レチノイドおよび epidermal growth factor (EGF) が, シンシチオトロホブラスト化の誘導因子として知られている^{34,36}. また, シンシチオトロホブラストは母体とのさまざまな連絡網を形成するために, 妊娠初期において母体基底脱落膜へとさかんに浸潤していく. Haimovici らは³⁷, マウストロホブラストの培養液に basic fibroblast growth factor (bFGF) や EGF を添加することで

浸潤能が促進することを示した。さらに Prouillac らは³⁸⁾, BeWo 細胞にホルスコリンを作用させたところ, 多核化をともなうシンシチオトロホブラスト化が促進することを報告した。これらより, bFGF とホルスコリンもシンシチオトロホブラストへの分化誘導因子の可能性がある。また, ピルビン酸や非必須アミノ酸を含めて MEM よりも栄養素が豊富な培養液は, JEG-3 細胞の分化に影響を及ぼす可能性がある。このような報告に基づいて, 本節では JEG-3 細胞の分化を促進すると考えられる各種培養条件で JEG-3 細胞層を形成し, TEER 値を指標にして細胞間隙透過性を比較検討することで, シンシチオトロホブラスト層により近づけた JEG-3 細胞層の作製に取り組んだ。

実験材料と方法

(1) 比較検討した JEG-3 細胞の試験培養条件

MEM に添加した各種因子の終濃度は, 1 mM ピルビン酸, 10 ng/mL Growth factor 群 (acidic fibroblast growth factor (aFGF), bFGF, EGF), 10 μ M レチノイド, 100 μ M ホルスコリンであった。非必須アミノ酸を含め MEM よりも栄養素が豊富な培養液には, DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), Ham's F-12, D/F (DMEM/Ham's F-12 (1:1)混合培地), D/F + aFGF, CSC (CSC[®]培地 (DS ファーマ))を用いた。CSC[®]培地の組成は, D/F 混合培地を基本培地として, 企業独自の aFGF 含有添加物 (セルブースト) を含んだ商品培地である。ミリセル[®]培養膜上で, 3 日間 MEM により JEG-3 細胞を培養してコンフルエントにした後, 試験培養条件を用いて 4 日間培養し, 形成された細胞層の細胞間隙透過性を TEER 値を指標にして比較検討した。

(2) 生細胞数および総蛋白量の測定

JEG-3 細胞をミリセル[®]の培養膜上に, 50,000 個/cm² の細胞密度で播種し, 3 日間 MEM で培養した後, 試験培養条件で 4 日間培養して細胞数と総蛋白量を測定した。細胞数は, ミリセル[®]培養膜を PBS で 2 度洗浄した後, 血球板を用いて計測した。総蛋白量は, 細胞溶解液 M-PER[®] (Pierce) 100 μ L 中で, 30 分間蛋白溶解後, Pierce BCA protein assay kit (タカラバイオ)を用いて測定した。

実験結果および考察

各種の試験培養条件を用いて JEG-3 細胞層を形成し, MEM 培地での培養群を対照に TEER 値の比較を行った (Fig. 6)。MEM 培地にピルビン酸を添加して作製した JEG-3 細胞層, および DMEM 群では対照群に比べて TEER 値に変化はなかった。aFGF, bFGF, EGF, レチノイド添加群, および培養液を Ham's F-12, D/F, D/F + aFGF, CSC[®]培地に変更することによって, TEER 値

の上昇が認められ, JEG-3 細胞層の細胞間隙がより密となることが示唆された. 一方, ホルスコリンは, BeWo および JEG-3 においてシンシチオトロホプラスト様分化の誘導試薬として知られているが^{5,18,23,38,41-45)}, 本結果では TEER 値の減少を認めて細胞間隙透過を増加させることが示唆されたことから, ホルスコリンの JEG-3 細胞層 TJ 形成能への影響は不明であった. これらすべての試験培養条件の中で, JEG-3 細胞層の細胞間隙透過を最も抑制することが示された群は, CSC[®]培地による JEG-3 細胞培養群であった.

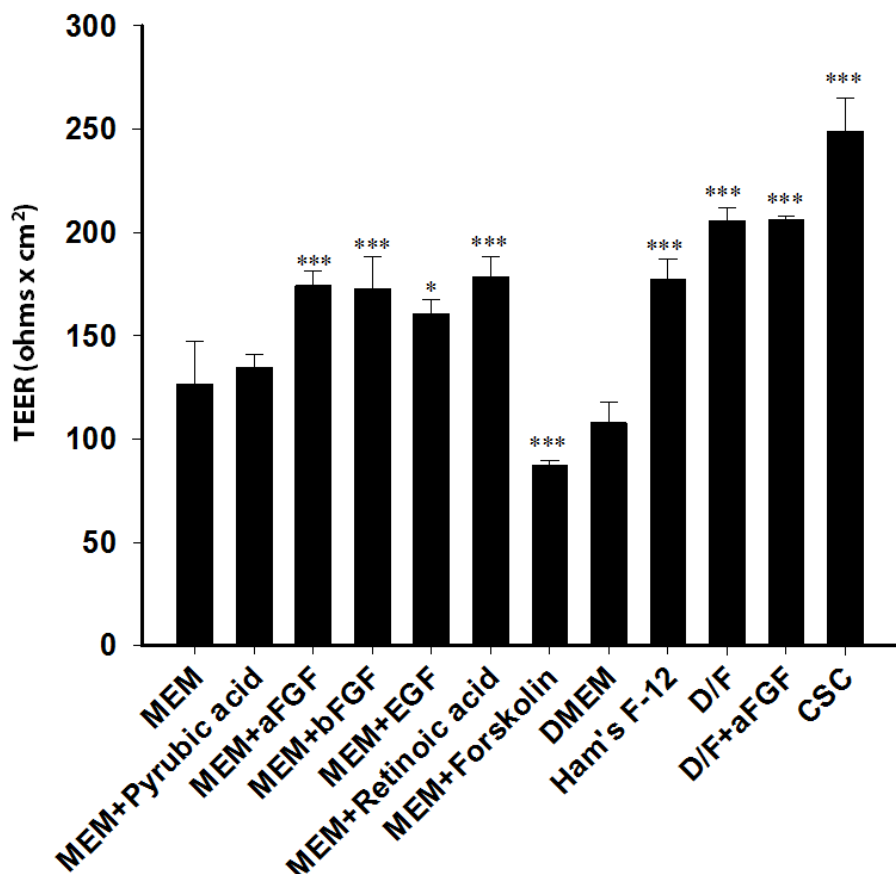


Fig. 6. Effects of several culture conditions on TEER values across JEG-3 cell layers. For each condition, the JEG-3 cells were cultured on Millicell[®] 24-well inserts for 4 d after initial culture in MEM for 3 d. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ (Tukey's multiple comparison test vs. MEM). Data points represent the mean \pm SD values of at least 4 different layers.

しかしながら, 本結果における TEER 値の上昇は, 単位面積当たりの生細胞数の単なる増加に起因することも考えられた. そこで, MEM 群と CSC[®]培地群のそれぞれについて, 生細胞数と総蛋白量の検討を行った(Fig. 7). その結果, 生細胞数と総蛋白量のいずれにおいても, MEM 群と CSC[®]培地群間に有意差は認められず, CSC[®]培地群による JEG-3 細胞層の TEER 値の上昇は, TJ の形成に基づく細胞間隙透過経路の抑制に起因することが強く示唆された.

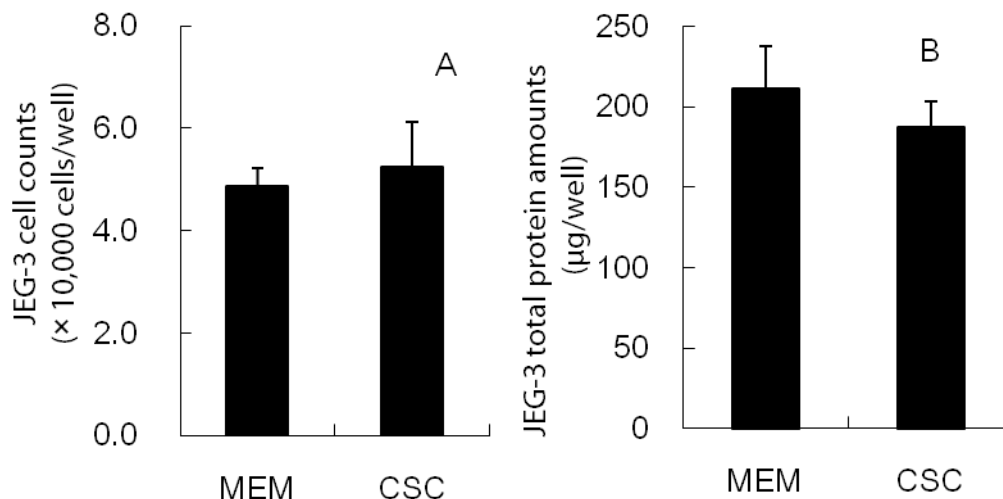


Fig. 7. Effects of culture conditions on growth (A) and total protein amounts (B) of JEG-3 cells. For each condition, the JEG-3 cells were cultured on Millicell® 24-well inserts for 4 d after initial culture in MEM for 3 d. Data points represent the mean \pm SD values of at least 4 different wells.

「実験材料と方法」の項目にも記述したが、CSC®培地は、D/F 混合培地を基本培地として、aFGF を含む添加物セルブーストが含まれる。本結果における CSC®培地を用いた TEER 値の上昇は、類似した培養液組成である aFGF を添加した D/F 培地より高く、これには aFGF 以外のなんらかの因子による影響があると考えられた。今後、これら因子を解明していくことで、さらに効率的に細胞層の細胞間隙透過を抑える条件を見いだすことができるものと期待できる。

本節において、CSC®培地を用いて培養した JEG-3 細胞層が最も細胞間隙経路を抑制しており、経細胞輸送経路を評価できる可能性をもった細胞層であることが判明した。次節では、CSC®培地を用いて培養した JEG-3 細胞層を用いて、さらに *in vitro* 胎盤薬物透過モデルとしての最適培養条件の検討を行った。これ以降、MEM で培養した JEG-3 細胞を Normal JEG (NJEG)細胞、および CSC®培地によって培養した JEG-3 細胞を Differentiating JEG (DJEG)細胞と称する。

第三節 JEG-3 層細胞間隙透過に及ぼすヒト臍帯静脈血管内皮細胞液性因子の影響

Fig. 2 で示したとおり、シンシチオトロホブラストを最外殻とする絨毛組織内には、胎児毛細血管が形成されている。胎児毛細血管は、臍帯動静脈を経て胎児へと繋がっている。Dadelszen らは⁴⁶⁾、シンシチオトロホブラストとヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) の共培養を行った培養上清が好中球を活性化させることを報告し、これらの細胞間で液性因子によるなんらかの相互作用が行われていることを見出した。HUVEC とシンシチオトロホブラスト間における液性因子による相互作用によって、胎盤機能を正常に維持している可能性は大いにある。したがって、HUVEC と JEG-3 間の液性因子による相互作用が、JEG-3 細胞のシンシチオトロホブラスト化を促す可能性が

あると考えられる。本節では、HUVEC と JEG-3 を共培養することによって、HUVEC と JEG-3 間の液性因子相互作用が DJEG 細胞層の細胞間隙透過性に及ぼす影響を検討した。

実験材料と方法

(1) HUVEC のセルカルチャーインサート培養膜裏面における培養

ミリセル[®]を反転して設置し、培養膜裏面をヒト絨毛由来細胞の培養時と同様に、コラーゲン Type I(新田ゼラチン):60% エタノール(1:3)の 50 μL でコーティングした。これに HUVEC を 10,000 個/ cm^2 の細胞密度で播種し、CSC[®]培地により培養して細胞層を形成した。ミリセル[®]培養膜裏面に HUVEC が接着増殖後は、ミリセル[®]を定法のとおり設置しなおして培養膜表面への JEG-3 細胞播種に供した。

(2) JEG-3 と HUVEC の共培養

HUVEC と JEG-3 の共培養の検討においては、ミリセル[®]培養膜を挟んで上層側に JEG-3 細胞層を作製し、下層側となるミリセル[®]培養膜裏面に HUVEC 層を形成した近接モデル(Proximate model)と、HUVEC 層をプレート底面に培養した遠接モデル(Distant model)を、JEG-3 細胞培養期間 7 日間で作製した(Fig. 8)。

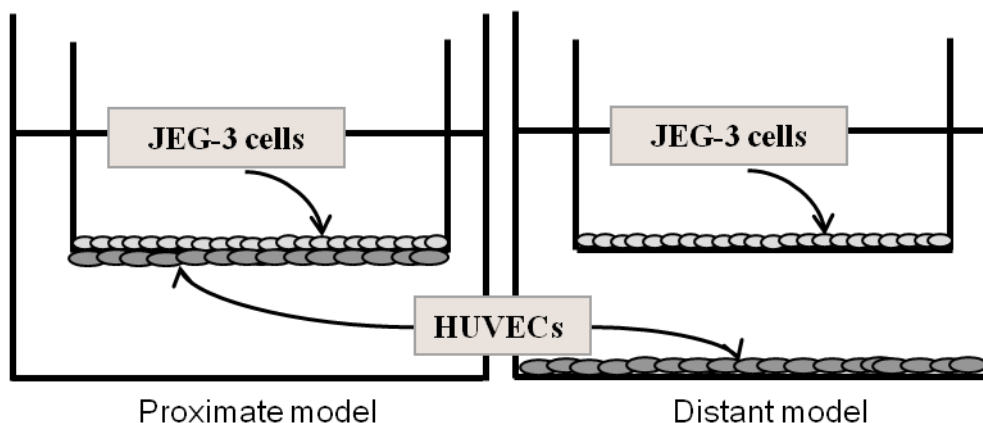


Fig. 8. Proximate and distant co-cultured models constructed by JEG-3 cells and HUVECs.

近接モデルでは、あらかじめミリセル[®]培養膜の下層側に HUVEC を培養した後、これまでと同様に、上層側に JEG-3 層を形成して共培養した。遠接モデルでは、CSC[®]培地により HUVEC を 24 ウェル培養プレート底面に培養し、ミリセル[®]培養膜の上層側に JEG-3 層を形成して HUVEC と共培養した。これらの系により、DJEG 細胞層細胞間隙物質透過性に対する、HUVEC との液性因子相互作用による影響を TEER 値により比較検討した。

実験結果および考察

まず、ミリセル[®]培養膜に培養した HUVEC 層が形成されていることを確認するため、クリスタルバイオレットで染色した後位相差顕微鏡によって鏡検した(Fig. 9). 本鏡検像から、HUVEC も JEG-3 と同様に CSC[®]培地による培養で 7 日目にはコンフルエントになっていることが確認でき、HUVEC のミリセル[®]培養膜裏面培養における細胞層の形成は可能であることが示された。

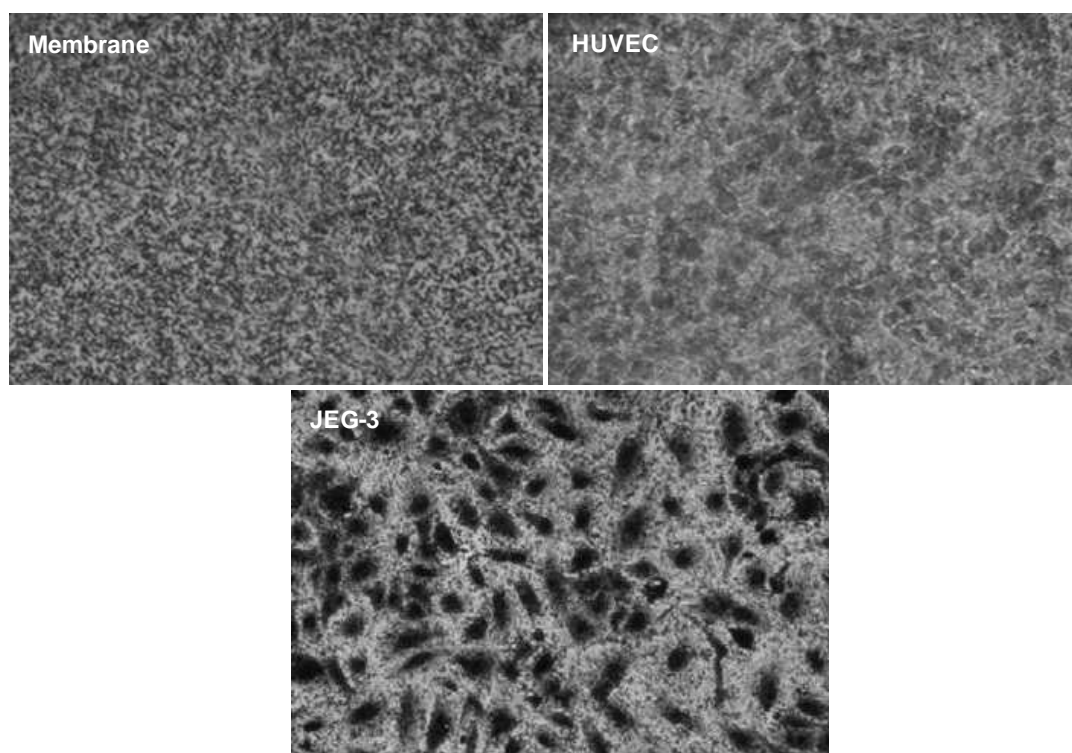


Fig. 9. Phase-contrast microscopy ($\times 200$) of membrane, HUVEC, and JEG-3 cells stained with 0.1% crystal violet.

次に、NJEG 細胞層, DJEG 細胞層, 遠接モデル, および近接モデルにおける TEER 値の比較を行った(Fig. 10). 前節の結果と同様に、NJEG 細胞層に比べて DJEG 細胞層では有意な TEER 値の上昇が観察され、DJEG 細胞層の細胞間隙透過抑制に再現性が認められた。さらに、DJEG 細胞を HUVEC と共培養して TEER 値を試験したところ、いずれのモデルにおいても DJEG 細胞層における TEER 値との有意差は認められなかった。したがって、DJEG 細胞と HUVEC の液性因子相互作用は、少なくともより細胞層の細胞間隙透過を抑制させることには影響しないことが示された。

HUVEC は、透過機能以外の JEG-3 細胞機能に影響する可能性や、HUVEC 以外の近隣組織の細胞に、共培養によってより生体内を反映した DJEG 細胞層を形成できるものが存在する可能性はある。これら細胞間相互作用による影響は今後の検討課題であるが、本節では CSC[®]培地による DJEG 細胞層が、現段階で最も簡便にかつ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、以後 DJEG 細胞層をシンシチオトロホブラスト層との類似性を詳細に検証していくためのモデル細胞層として用いた。

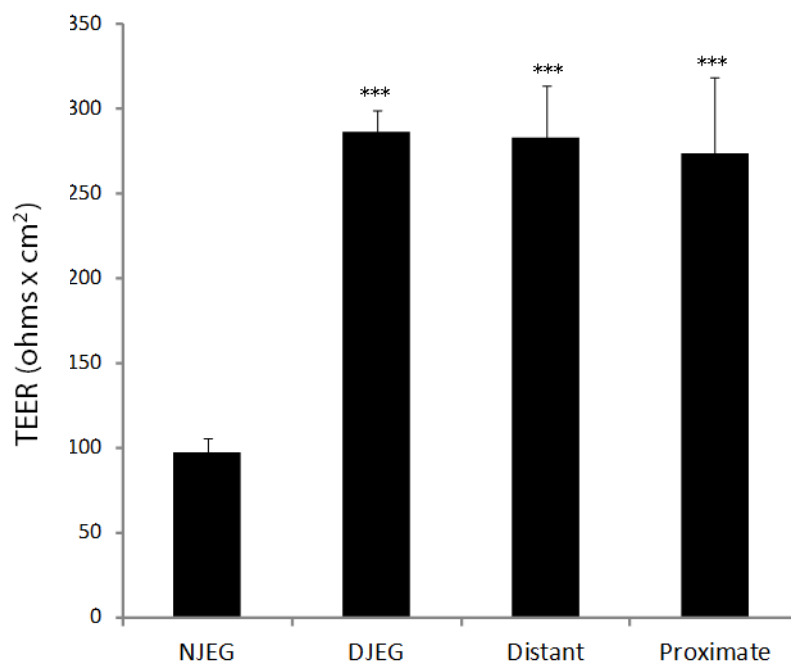


Fig. 10. Differences of TEER among JEG cell monolayers cultured under four conditions. Results represent mean \pm SD of 4 determinations. After JEG-3 cells were cultured in MEM for 3 days, the cells were cultured in each condition for 4 days, MEM (NJEG), CSC[®] medium (DJEG), and distant and proximate co-cultured with HUVECs in CSC[®]. *** $p < 0.001$, compared with NJEG using multiple comparison method with Turkey.

一方、絨毛組織には胎盤関門の主要層であるシンシチオトロホブラスト層の他にも、サイトトロホブラスト層や胎児由来毛細血管内皮細胞層などが存在する。中でも血管内皮細胞層は血液—脳関門に代表されるように、生体内の各種の組織において障壁層および選択的物質透過層としての役割を有している。数種のトランスポーターは絨毛組織内の胎児由来毛細血管中に発現していることも知られており、胎盤関門においても胎児毛細血管内皮細胞層は絨毛間腔を満たしている母体血と絨毛組織内の胎児血の間で、シンシチオトロホブラスト層と共同で選択的な物質交換を行っている可能性もある。しかしながら、今回 HUVEC と JEG-3 の共培養を検討するにあたって、HUVEC 層の TEER 値を測定したところ $20 \text{ ohms} \cdot \text{cm}^2$ 程度であり(データ非掲載)、血管内皮細胞層の単純な障壁としての機能は HUVEC と JEG-3 細胞層の共培養モデルではほとんど無視できると考えられた。今後の検討課題としては、胎盤関門における絨毛内胎児由来血管内皮細胞層のトランスポーターなどを介した、選択的物質透過機能の関与を評価することにも取り組んでいく必要があるものとする。

第四節 小括

医薬品の胎児安全性評価は、現在妊娠転帰事例から解析される疫学調査に頼らざるをえず、その情報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。催奇形性、胎児毒性、服薬した妊娠時期の評価項目については、現存の知見に基づいて、我が国の添付文書、アメリカ食品医薬品局 (FDA)、およびオーストラリア医薬品評価委員会などで、医薬品の胎児危険度分類法が示されており^{2,47)}、妊娠時薬物療法の支援対策として現在も改定に向けて審議が継続されている。これらの医薬品の胎児安全性評価項目の中でも、医薬品のヒト胎児移行性情報はごくわずかであり、実地周産期医療においてヒト胎児移行性を考慮できる医薬品はほとんど無い。医薬品のヒト胎児移行性が比較評価できれば、胎児移行をともなわずに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。したがって、本研究では医薬品の胎児移行性情報の蓄積支援を目的として、医薬品のヒト胎児移行性評価に適う *in vitro* 胎盤薬物透過評価モデルの構築を試みた。

In vitro 胎盤薬物透過評価モデルによって精度良く医薬品の胎児移行性を評価するためには、モデル細胞層の経細胞輸送経路を評価できる必要があり、まずモデル細胞層における薬物の細胞間隙透過をできる限り抑えておかねばならない。さらに薬物の胎盤透過性を反映するためには、胎盤関門の主要層であるシンシチオトロホブラスト層に類似した透過機能を有するモデルを作製する必要がある。本章では、ヒト絨毛由来細胞株を用いて、経細胞輸送を評価できる可能性をもった細胞層の作製を試みた。

まず、MEM によって培養したヒト絨毛由来 BeWo 細胞層と JEG-3 細胞層の細胞間隙透過性を比較検討し、JEG-3 細胞層は BeWo 細胞層に比べて著しく細胞間隙透過性が低いことが示された。しかし、経細胞輸送経路を評価できるレベルには至らず、JEG-3 細胞の TJ 形成能に不備がある可能性が考えられた。そこで次に、細胞間隙透過をさらに抑制するために、シンシチオトロホブラスト様の分化を促すいくつかの因子の報告に基づいて各種培養条件の下で JEG-3 細胞層を形成し、細胞間隙透過を比較した。この結果、CSC[®]培地で培養した JEG-3 細胞層(DJEG 細胞層)が、より強く細胞間隙透過経路を抑えることができることが判明した。さらに、周辺細胞との相互作用の影響を検討するために、HUVEC と DJEG 細胞の共培養を行ったが、DJEG 細胞層の細胞間隙透過性には影響しなかった。これらにより、まずは細胞間隙輸送経路を低いレベルに抑えられることで、経細胞輸送を評価できる可能性を持ち、共培養不要の単純系である *in vitro* 胎盤薬物透過評価モデル細胞層として、CSC[®]培地によって培養した DJEG 細胞層を選択した。

一方、胎盤を介した薬物の胎児への有害な影響は、薬物そのものが胎児に移行して及ぼす影響以外にも、薬物の絨毛組織や母体への影響からエキソソームなどを介した胎児への蛋白質などの輸送やサイトカインの胎児側への放出などによって間接的に及ぼされることも考えられる。例

えば、歯周病原菌の lipopolysaccharide (LPS)放出に起因する炎症から TNF- α をはじめとした各種のサイトカインが子宮に影響または胎児へ移行することで、早産や胎児成長不全が引き起こされることが知られている。Keelan らは⁴⁸⁾、満期摘出胎盤を用いて胎盤を介した母体側層と胎児側層の灌流モデルを作製し、母体側の LPS 刺激により分泌誘導されるサイトカインを特定することに取り組んだ。この報告によると、LPS 刺激によって誘導される母体側のサイトカインは、IL-6, IL-7, TNF- α が約 10 倍程度の濃度となるが、この中で TNF- α の胎児側濃度が上昇していない。また、特に IL-7 と TNF- α については、LPS 刺激による誘導を抗炎症薬スルファサラジンが母体側においても顕著に抑制することを示した。このような母体側への薬物などの刺激によって引き起こされる胎児への有害性が、なんらかの因子の母体血中濃上昇によるものであるのか、胎児に移行して引き起こされるものであるのかなど、関連するサイトカインなどの胎児移行を評価していくことで有害事象に起因する分子を特定していくことは、医薬品の胎児安全性情報の蓄積支援を目指す本研究の今後の展望としても重要である。また、薬物が胎盤自体に影響することによって胎盤透過性が亢進する場合も考えられ、このような課題に対応していくためにも、胎盤透過性を評価するモデルでは、より薬物に対する反応性が胎盤関門の主要層であるシンシチオトロホブラストと類似していることが望まれる。

本章では、まずは胎盤関門の非選択的な薬物透過を反映できるモデルとして、DJEG 細胞層が現段階では最も妥当であることを見出した。さらに DJEG 細胞層がシンシチオトロホブラスト様のさまざまな細胞特性とトランスポーターを介した選択的透過機能を有していれば、医薬品の胎児移行性を比較評価することができる。次章では、DJEG 細胞層におけるシンシチオトロホブラスト様の分化指標およびトランスポーター群発現レベルの解析を行うことによって、DJEG 細胞層とシンシチオトロホブラスト層の類似性を検証した。

第二章 Differentiating JEG-3 (DJEG)細胞の *in vivo* 類似性解析

In vitro 細胞モデルにおいては、生体内の細胞特性をより正確に反映していることが理想的であるが、生体内で相互に関連している全ての細胞特性を検証すること、および *in vitro* 細胞モデルで全ての生体内機能を反映させることはほぼ不可能である。そこで、目的とするモデルに最低限必要な細胞特性を含めて、*in vitro* 細胞モデルが有する生体内類似性をできる限り確認することが必要となる。本研究の目的である *in vitro* 胎盤薬物透過評価モデルにおいては、胎盤関門の主要層であるシンシチオトロホブラスト層との類似性を検証することが妥当である。サイトトロホブラストからシンシチオトロホブラストへと分化する過程ではいくつかの分化指標が知られており(Fig. 11), DJEG 細胞層におけるこれらの分化指標を確認することで主要なシンシチオトロホブラスト層との類似性を検証することができる。

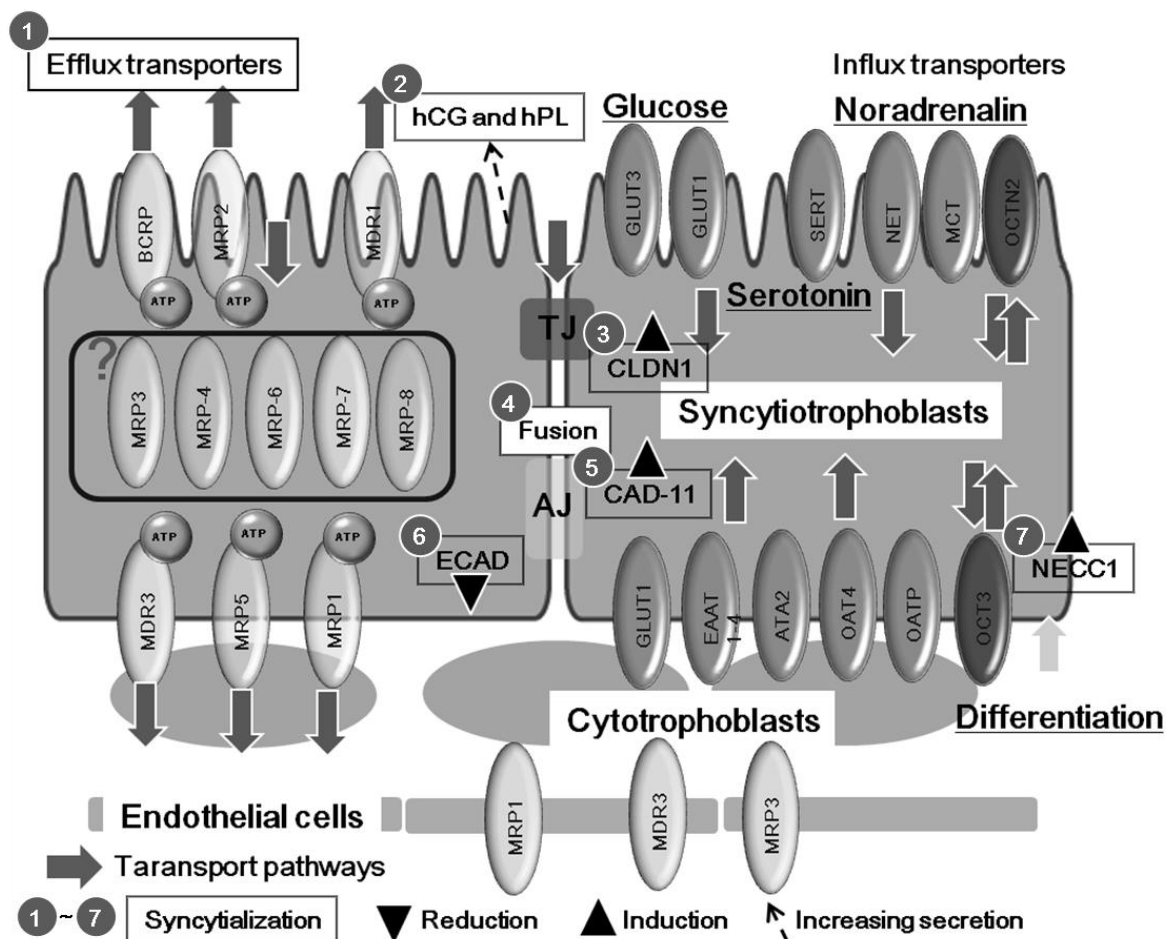


Fig. 11. Predicted transporter profiles expressed to the syncytiotrophoblast and index markers for syncytialization from cytotrophoblasts. CLDN1: claudin-1, CAD-11: cadherin-11 (OB-cadherin), hCG: human chorionic gonadotropin, hPL: human placental lactogen, NECC1: not-expressed choriocarcinoma 1, MDR1: multidrug resistance protein-1 (P-glycoprotein), MRP: multidrug resistance-associated proteins, BCRP: breast cancer resistance protein, GLUT: glucose transporter, SERT: serotonin transporter, NET: norepinephrine transporter, MCT: monocarboxylate transporter, OCT: organic cation transporter, OAT: organic anion transporter, ATA: amino acid transporter, EAAT: excitatory amino acid transporter.

まず、シンシチオトロホブラスト化の過程では細胞間隙により強力な TJ が形成され、シンシチオトロホブラスト層の細胞間隙物質透過を制限している。一般に、TJ 関連蛋白には膜裏打ち蛋白である ZO-1、膜貫通型蛋白である occludin (OCLN)や CLDN1-5 などが知られている。シンシチオトロホブラストにおいてもこれらの TJ 関連蛋白の発現が認められており⁴⁹⁻⁵¹⁾、Harada らは⁴³⁾、ホルスコリンによって分化させた BeWo 細胞では CLDN1 の発現が誘導され、CLDN5 の発現が減弱される傾向があることを報告した。また、サイトトロホブラストは分化の過程で細胞融合能を獲得し多核細胞層であるシンシチオトロホブラスト層となる^{3-5,50-52)}。これには少なくとも AJ 関連蛋白である ECAD と cadherin-11 (CAD-11)が関連しており、融合時に ECAD の発現減少と CAD-11 の発現誘導を伴うことが報告されている^{42,50-56)}。これら TJ, AJ 関連蛋白の発現変化および細胞融合能の獲得はシンシチオトロホブラスト化の指標として考えられる。

また、シンシチオトロホブラスト化の過程においてはホルモン分泌に変化が起こることが知られており、ヒト絨毛ゴナドトロピン(hCG)およびヒト胎盤性乳腺刺激ホルモン(hPL)の分泌が促進することが報告されている^{38,40,44,45,55-62)}。これら hCG や hPL の分泌能亢進もシンシチオトロホブラスト化のひとつの指標である。また、転写因子のひとつである not-expressed choriocarcinoma 1 (NECC1)は、ヒト絨毛由来細胞株にはほとんど認められず、この発現が誘導されることもシンシチオトロホブラスト化の指標となる^{63,64)}。

さらに精度良く胎盤関門薬物透過を評価できるためには、モデル細胞層がシンシチオトロホブラスト層の有する生体異物からの胎児保護機能を反映できる必要がある。胎盤関門における生体異物の選択的物質透過はトランスポーターによって担われており、中でも生体異物からの胎児保護には efflux トランスポーターの異物排除機能が不可欠である。シンシチオトロホブラストには、ATP-binding cassette (ABC)トランスポーターである各種 efflux トランスポーターの発現が認められている。シンシチオトロホブラストで機能している efflux トランスポーターが、本モデル細胞層でも機能していることを検証するためには、まずは efflux トランスポーター群の発現が確認されなければならない。シンシチオトロホブラストに発現が認められている ABC トランスポーターには、P-glycoprotein (MDR1)^{16,38,65-67)}、multidrug resistance-associated proteins (MRP)1-MRP8^{3,4,38,66-72)}、および breast cancer resistance protein (BCRP)などが知られており⁷²⁻⁷⁴⁾、中でも BCRP のシンシチオトロホブラストにおける発現は強力であるため、BCRP の発現誘導がシンシチオトロホブラスト化の指標としても報告されている^{4,74,75)}。また、efflux トランスポーターには、apical 側と basolateral 側への局在性が明らかとなっているものもあり^{68-70,75-77)}、BCRP では主に apical 側に局在していることが知られている⁷⁵⁾。これらの局在性も、シンシチオトロホブラスト化の指標と考えられる。

これらの報告に基づいて、本章では DJEG 細胞層におけるシンシチオトロホブラスト様の分化指標の解析を行い、まずは DJEG 細胞層がシンシチオトロホブラスト様の表現型を獲得している程度を検証した。

第一節 DJEG 細胞層の形態的な *in vivo* 類似性

初代培養したサイトトロホブラストは、至適培養条件下で細胞間の融合が起こり、細胞境界が認められない多核細胞層であるシンシチオトロホブラスト層へと分化することが知られている^{4,52,78-83}。前章で選択した DJEG 細胞にシンシチオトロホブラスト様の分化が起こっているのであれば、シンシチオトロホブラスト様分化指標のひとつとして、DJEG 細胞が NJEG 細胞には認められないシンシチオトロホブラスト様の細胞融合能を獲得している可能性がある。本節では、まず NJEG 細胞と DJEG 細胞の形態的な相違点を確認した後、免疫染色によりシンシチオトロホブラスト細胞融合能獲得に関連する AJ 関連蛋白である ECAD と CAD-11 の細胞内局在性を検出し、DJEG 細胞がシンシチオトロホブラスト様分化指標のひとつである細胞融合能を獲得している可能性を検討した。

実験材料と方法

(1) AJ 関連蛋白の蛍光免疫染色

NJEG 細胞および DJEG 細胞をガラススライド上に培養し、 -20°C で 2 分間メタノール固定を行った。このガラススライドをブロッキングワン[®](Nacalai Tesque)で室温 30 分間ブロッキングした。その後、1 次抗体 Mouse monoclonal antibodies specific for human CDH11, desmoplakin I and II (Abcam), および Mouse monoclonal antibody (BXP-21) directed against human ECAD (R&D)を室温で 60 分間振盪した。次いで、2 次抗体 Alexa Fluor 488 (Molecular Probes)と核染色として 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma) 100 nM で室温 60 分間振盪し、共焦点レーザー顕微鏡により蛍光撮影した。

(2) パラフィン固定による、細胞層断面の Hematoxylin-Eosin (HE)染色および蛍光免疫染色

NJEG 細胞および DJEG 細胞層をミリセル[®]上に作製し、サンプルカセットに封入して 10%ホルムアルデヒド PBS 溶液により 30 分間固定した。これをパラフィン包埋し、 $0.4\ \mu\text{m}$ の厚さで切片を作製し、スライドガラスに移し、ホットプレート(54°C)上で 24 時間乾燥した。HE 染色においては、脱パラフィンを行い、ヘマトキシリン・エオシンにより染色し、光学顕微鏡により観察した。蛍光免疫染色においては、脱パラフィン後、マイクロウェーブにより抗原賦活し、ヤギ血清によってブロッキングした後、ECAD と CAD-11 を蛍光免疫染色した。

実験結果および考察

まず、位相差顕微鏡によって NJEG 細胞層および DJEG 細胞層を鏡検したところ、NJEG 細胞

層においては個々の細胞の輪郭が明確であり、シンシチオトロホブラスト様の形態は観察されなかったのに対し、DJEG 細胞層では細胞間で融合していると考えられるシンシチオトロホブラスト様の形態が観察された (Fig. 12). これによって、NJEG 細胞は比較的サイトトロホブラスト様の特性を有し、DJEG 細胞はシンシチオトロホブラストへと機能的分化を行っている可能性が示唆された。

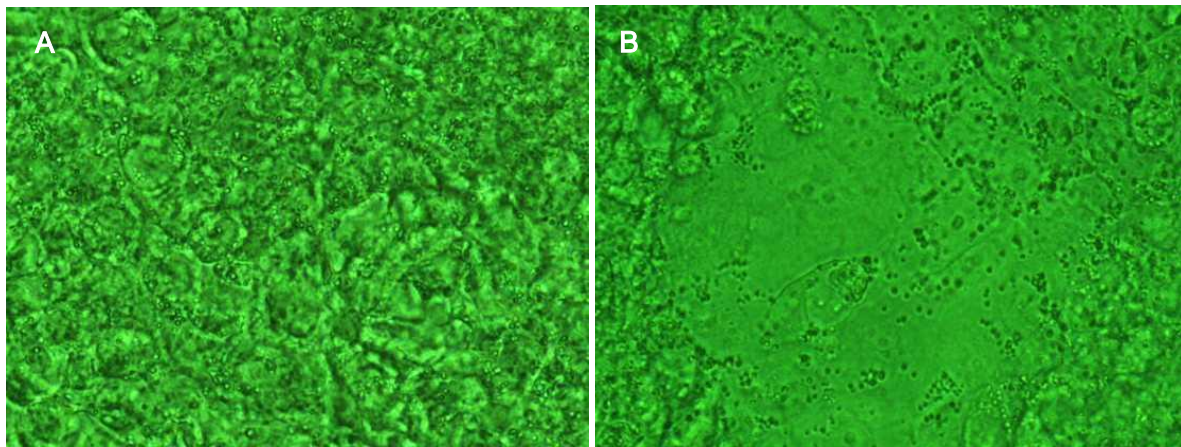


Fig. 12. Phase-contrast microscopy ($\times 200$) of JEG-3 cells cultured in MEM (A: NJEG) and CSC[®] medium (B: DJEG) on plastic plates for 7 days.

次に、シンシチオトロホブラストの細胞融合能獲得時にともなう ECAD の発現減弱、CAD-11 の発現誘導、および細胞境界を示す desmoplakin の発現について、NJEG 細胞と DJEG 細胞間で蛍光免疫染色により比較を行った (Fig. 13). その結果、DJEG 細胞においては ECAD の発現抑制傾向が認められ、CAD-11 では微弱ながら発現誘導の傾向が認められた。また、NJEG 細胞および DJEG 細胞いずれにおいても、ECAD は細胞境界付近に局在していることが認められ、細胞接着に関連する機能を担っているものと考えられた。さらに desmoplakin の局在性では、DJEG 細胞の多核化をともなう細胞境界線の広がり方が認められた。また、CAD-11 については NJEG 細胞層断面と DJEG 細胞層断面のパラフィン切片による蛍光免疫染色においても (Fig. 14 right column), 微弱ではあるものの apical 側に CAD-11 の発現誘導が認められた。これらの結果に基づいて、サイトトロホブラストからシンシチオトロホブラストへの分化の過程と同様に、DJEG 細胞においても ECAD 発現減弱と CAD-11 発現誘導をともなったシンシチオトロホブラスト様細胞融合能の獲得傾向があることが示唆された。したがって、DJEG 細胞層において TEER 値を上昇させた原因のひとつとして、シンシチオトロホブラスト様細胞融合能の獲得が影響しているものと考えられる。また、JEG-3 細胞は維持培養されている限り細胞融合能を持たないことが知られているが⁵⁾、本節における結果は、JEG-3 を CSC[®] 培地によって培養することで、本研究においてはじめてシンシチオトロホブラスト様細胞融合能を獲得する可能性があることを示したものである。しかしながら、CAD-11 の発現誘導は微弱であり、シンシチオトロホブラスト様の多核融合細胞層を反映するには、さらなる培養条件の検討が必要であると考えられる。

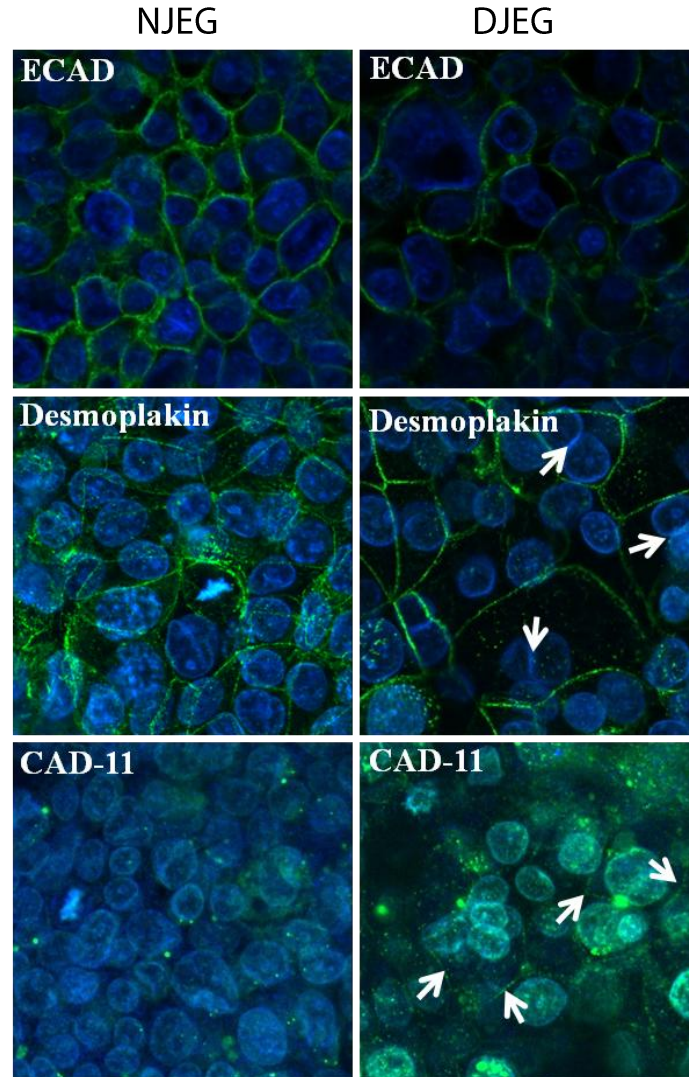


Fig. 13. Differences between NJEG and DJEG cells with respect to the ECAD, desmoplakin, and CAD-11 protein expression levels investigated using immunofluorescence. The green curves indicate the expression of the proteins, ECAD, desmoplakin, and CAD-11. Blue circles show counter-staining with DAPI. The arrow in desmoplakin in the DJEG column may indicate a fusion of two cells. The arrow in CAD-11 in the DJEG column indicates weak CAD-11 expression.

さらに DJEG 細胞層の形態的な特性を確認したところ、細胞層断面のパラフィン切片 HE 染色 (Fig. 14 left column)において、JEG-3 細胞層の多層性が認められた。本結果を裏付けるものとして、BeWo 細胞層や JEG-3 細胞層の多層性は以前の報告でも認められており^{17,23,82)}、未だヒト絨毛由来細胞株の *in vitro* における単層膜形成の報告は無い。しかしながら、物質透過を制御するシンシチオトロホブラスト層を主要層としているものの、胎盤関門にはサイトトロホブラスト層も存在している。本節の結果によれば、DJEG 細胞層は複層であり、また微弱ながら CAD-11 の発現が apical 側に認められたことから、本 DJEG 細胞層モデルが CAD-11 未発現のサイトトロホブラスト層と CAD-11 発現誘導をとまなうシンシチオトロホブラスト層からなる、より胎盤関門を反映した複層モ

デルである可能性が示唆された. *In vitro* 細胞層モデルによって透過性評価を行うには, 系の均一性や解析の単純化の観点から単層モデルが適切ではある. しかしながら, 胎盤関門様の安定な *in vitro* 細胞層単層モデルが存在しない現状では, よりシンシチオトロホブラスト層に類似した本 DJEG 細胞層を用い, TEER 値を揃えることによって均一な評価系を作製することで物質透過の相対的な評価を行うことが妥当であると考えられる. 今後, 単層モデル作製への取り組みとともに, 本 DJEG 細胞層モデルが胎盤関門を反映した複層モデルを示している可能性もさらに詳細に検証していく必要がある.

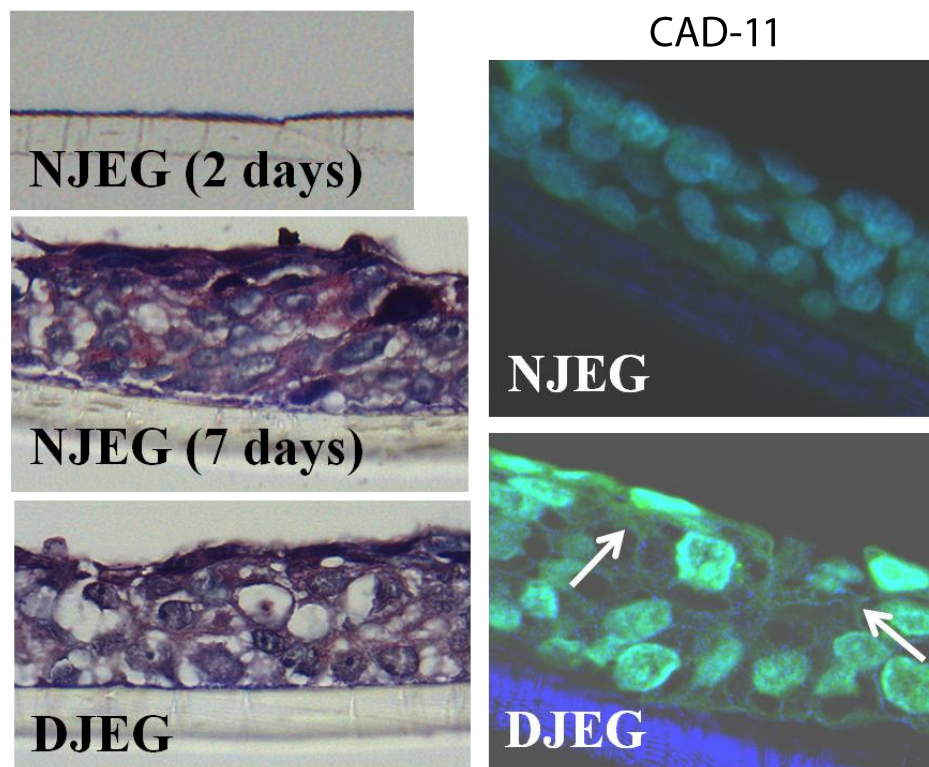


Fig. 14. Differences between NJEG and DJEG on staining with hematoxylin and eosin (HE: left column) and with respect to the expression of CAD-11 using immunofluorescence (right column) in paraffin sections. The right column arrows indicate the expression of the proteins, CAD-11. Blue circles show counter-staining with DAPI. NJEG (2 days) indicates NJEG cultured in MEM for 2 days.

第二節 DJEG 細胞におけるシンシチオトロホブラスト様分化指標の発現レベル解析

DJEG 細胞層に, 透過機能を含めてシンシチオトロホブラスト層に特徴的な細胞機能が備わっていることをできる限り検証するためには, まずそれらに関連する蛋白および mRNA の発現を確認する必要がある. ここまでの結果により, DJEG 細胞層における細胞間隙透過が経細胞輸送の評価が可能である程度に抑制されていたこと, また細胞融合能の獲得傾向を示す形態変化が認められたことが, シンシチオトロホブラスト様の細胞機能を獲得している可能性として示された. さらに, 少なくともシンシチオトロホブラスト様分化指標として報告されている hCG や hPL などのホルモ

ン分泌の亢進や NECC1, efflux トランスポーター群, TJ 関連蛋白, AJ 関連蛋白の発現レベルについて, DJEG 細胞での検証を行うことで DJEG 細胞層の胎盤関門モデルとしての妥当性を高めることができる。

これらの分化指標のうち DJEG 細胞層における efflux トランスポーター群のシンシチオトロホブラスト層類似性は, トランスポーターを介した薬物透過を評価するにあたって極めて重要な検証項目である。その中でも, 胎盤関門において主な異物排出機能を担う BCRP は胎児への薬物移行を制御する上で非常に重要な役割を果たしており, シンシチオトロホブラスト層で高い発現レベルが確認されている。本 DJEG 細胞層モデルにおいても, BCRP の高い発現レベルが確認されることは, BCRP を介したシンシチオトロホブラスト様の薬物透過を評価するための必要条件と考えられる。また Evseenko らは⁴⁾, サイトトロホブラストのシンシチオトロホブラスト化によって, BCRP の発現が誘導されるものの MDR1 の発現は抑制されることを報告した。これらの発現レベルの変動も, シンシチオトロホブラスト化の分化指標として用いることができる。さらに, BCRP とは別のサブファミリーに属する efflux トランスポーター群 MRP1-8 (MRPs)では, シンシチオトロホブラストにおける発現プロファイルが明らかとなっており⁶⁸⁾, 本 DJEG 細胞層モデルにおける MRPs の発現プロファイルを確認することで, これらの基質薬物の担体輸送を評価できるモデルとしての可能性を見いだすことができる。

また, 前章において DJEG 細胞層の TEER 値の上昇は単なる細胞増殖ではないことが判明したが, TEER 値の上昇にシンシチオトロホブラスト様の TJ が形成されている可能性を検証するためには, TJ 関連蛋白の発現レベルを確認する必要がある。さらに, 細胞融合能獲得の指標となりうる ECAD と CAD-11 について, NJEG 細胞層と DJEG 細胞層間での蛋白発現レベルを比較検討することで, 前節において示唆された DJEG 細胞の細胞融合能獲得の可能性を裏付けることができる。

本節では, これらのシンシチオトロホブラスト様分化指標の発現レベルを解析することによって, DJEG 細胞層におけるシンシチオトロホブラスト化の可能性を検証し, 胎盤関門モデルとしてのさらなる妥当性を見いだすことに取り組んだ。

実験材料と方法

(1) 各種 mRNA 発現レベルの multiplex RT-PCR 法による半定量

各種培養液により JEG-3 細胞を培養後, RNeasy protect cell mini kit (Qiagen)を用いて total RNA を抽出し, その 1 µg から iScript[®] cDNA synthesis kit (Bio-Rad)により first strand cDNA 鋳型を得た。この cDNA を RT-PCR の鋳型として, hPL, NECC1, BCRP, MDR1, MRPs, OCLN, ZO-1, CLDN1, およびハウスキーピング遺伝子として β -actin (ACTB)のプライマーにより(Table 1),

multiplex PCR assay kit を用いて RT-PCR を行った。PCR には、GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) を用いた。PCR 条件は、denaturation 94°C, 30 秒, annealing 60°C, 90 秒, extension 72°C, 90 秒, 25 (ACTB), 30 (BCRP, ZO-1, CLDN1), 35 (hPL, NECC1, MDR1, OCLN), 35 (MRPs) サイクルとした。同サイクル数のターゲットジーンの組み合わせ (1) MRPs, 2) hPL, NECC1, MDR1, OCLN, 3) BCRP, ZO-1, CLDN1, 4) ACTB (単独)) で各プライマーを混合してプライマーセットを作製し、これら 4 種の multiplex RT-PCR を行った。PCR 産物の電気泳動は、2% アガロースゲルを用い、エチジウムブロマイドで染色後、UV ライトを照射して観察した。

(2) 各種 mRNA 発現レベルの TaqMan® real-time RT-PCR 法による定量

Multiplex RT-PCR 法によって発現誘導が認められた mRNA に関しては、TaqMan® gene expression assays (ABI) を用いて、各種培養液により培養した JEG-3 の mRNA 発現レベルを定量した。TaqMan® gene expression assays は、hPL, BCRP, NECC1, および CLDN1 をターゲットとした kit を使用した。ACTB (encoded by the *ACTB* gene, TaqMan® human endogenous control) をハウスキーピングジーンとし、multiplex RT-PCR 法と同様に作製した cDNA 鋳型を用いて real-time PCR detector (Opticon®2; Bio-Rad) により増幅定量を行った。PCR 条件は、50°C, 2 分と 95°C, 10 分の前活性化の後、denaturation 95°C, 15 秒, annealing と extension 60°C, 60 秒, 40 サイクルとした。

(3) BCRP と ECAD 蛋白発現レベルの定量

MEM による培養 3 日間の NJEG 細胞 (M3 細胞), 7 日間の NJEG 細胞, および後半 4 日間を CSC® 培地で培養した DJEG 細胞を PBS で洗浄し、M-PER® 100 µL で 30 分間溶解して蛋白溶解液を得た。蛋白溶解液を、10,000g で 20 分間遠心し、その上清を BCA kit (Pierce) で蛋白定量を行い、ウェスタンブロッティングに用いた。1 レーンの蛋白量は 20 µg で電気泳動を行い、PVDF メンブレンに転写し、1 次抗体 Mouse monoclonal antibodies directed against human BCRP (Calbiochem), Mouse monoclonal antibody (BXP-21) directed against human ECAD (R&D), および Mouse monoclonal antibody (A1978) directed against human ACTB (Sigma) を用いて ECL plus (GE Healthcare) による発光検出を行った。

(4) hCG の定量

MEM によって前培養された JEG-3 細胞を、MEM および CSC® 培地によって 3 日間さらに培養し、培養上清を回収した。この培養上清を 4°C, 8,000 × g で 5 分間遠心分離し、上清中の hCG を hCG ELISA Kit (Cosmo Bio) により定量した。

Table 1. Positions and amplified fragment length of the primer sequences used for multiplex RT-PCR

Gene			Sequence (Position)	NCBI GenBank Accession No.	Product Size (bp)
MRP1	Sense	1978	GGTCATCAGCAGCATCGTG	NM_004996	71
	Antisense	2048	GCTCCTCATGGGAGAGAAAAG		
MRP2	Sense	2071	CTCCTTGATATCAGCCATGC	NM_000392	91
	Antisense	2161	GGACTGCTGTGGGACATAGG		
MRP3	Sense	4315	GGACTTCCAGTGCTCAGAGG	NM_003786	110
	Antisense	4424	CCTCGTCTAAAACCAGGATGC		
MRP4	Sense	930	GGATCAGGACCATGAATGAAG	NM_005845	130
	Antisense	1059	CAGGAACTTCTCAGAATCTTGG		
MRP5	Sense	543	GGAGCTCTCAATGGAAGACG	NM_005688	149
	Antisense	691	GGCAGAAGATCCACACAACC		
MRP6	Sense	1694	GGCCGAGAATGCTATGAATG	NM_001171	170
	Antisense	1863	CACCAGGGTCAACTTCTTCC		
MRP7	Sense	4139	CCTGTTGTTGGTGCTCTTCC	NM_033450	190
	Antisense	4328	GGCCCTGTCTTATGTAGGC		
MRP8	Sense	1654	CAACCTGGTGGTGTCCAAG	NM_032583	251
	Antisense	1904	GATTCAGGGAGCAGCAGTG		
MDR1	Sense	2094	CAGCCTTGACACAGAAAGC	NM_000927	349
	Antisense	2442	GATCCACGGACACTCCTACG		
BCRP	Sense	773	GCTGCAAGGAAAGATCCAAG	NM_004827	501
	Antisense	1273	GGCCAATAAGGTGAGGCTATC		
NECC1	Sense	219	TCAACAAGGTCGACAAGCAC	NM_139212	402
	Antisense	620	AGCCACACCATTTTTCCAGT		
OCLN	Sense	215	CCGAGTTTCAGGTGAATTGG	NM_002538	248
	Antisense	462	GGACTTTCAAGAGGCCTGGA		
ZO-1	Sense	648	ATGTGCTGAAAGGAGGACCA	NM_003257	198
	Antisense	845	CTGGTTCAGGATCAGGACGA		
hPL	Sense	259	AGCTGGCCATTGACACCTAC	NM_001317.3	301
	Antisense	559	TGGATGCCTTCTCTAGGTC		
CLDN1	Sense	419	GGCAGATCCAGTGCAAAGTC	NM_021101.4	350
	Antisense	768	AAGGCAGAGAGAAGCAGCAG		
ACTB	Sense	888	GTGGCATCCACGAAACTACC	NM_001101	210
	Antisense	1097	CGATCCACACGGAGTACTTG		

実験結果および考察

まず、各種培養条件による JEG-3 細胞において、シンシチオトロホブラスト化を示す分化指標の mRNA 発現レベルを multiplex RT-PCR 法によって確認した(Fig. 15). その結果、シンシチオトロホブラスト化の分化指標として知られている hPL, NECC1, BCRP について、MEM によって培養された NJEG 細胞に比べ CSC[®]培地によって培養された DJEG 細胞では、より強く発現誘導されていた。特に、シンシチオトロホブラストで発現レベルが最も高いことが知られている efflux トランスポーターBCRP については、DJEG 細胞での発現誘導が高レベルであった。さらに、シンシチオトロホブラストに分化することによって発現誘導されることが認められている TJ 関連蛋白 CLDN1 が、DJEG 細胞においても発現誘導されていることが示された。TJ 関連蛋白については、CLDN1 に加えて微弱ながらも ZO-1 と OCLN でも発現誘導が認められており、DJEG 細胞において TJ 形成能が亢進していることが示唆された。シンシチオトロホブラストにおいても TJ 形成能の亢進は認めら

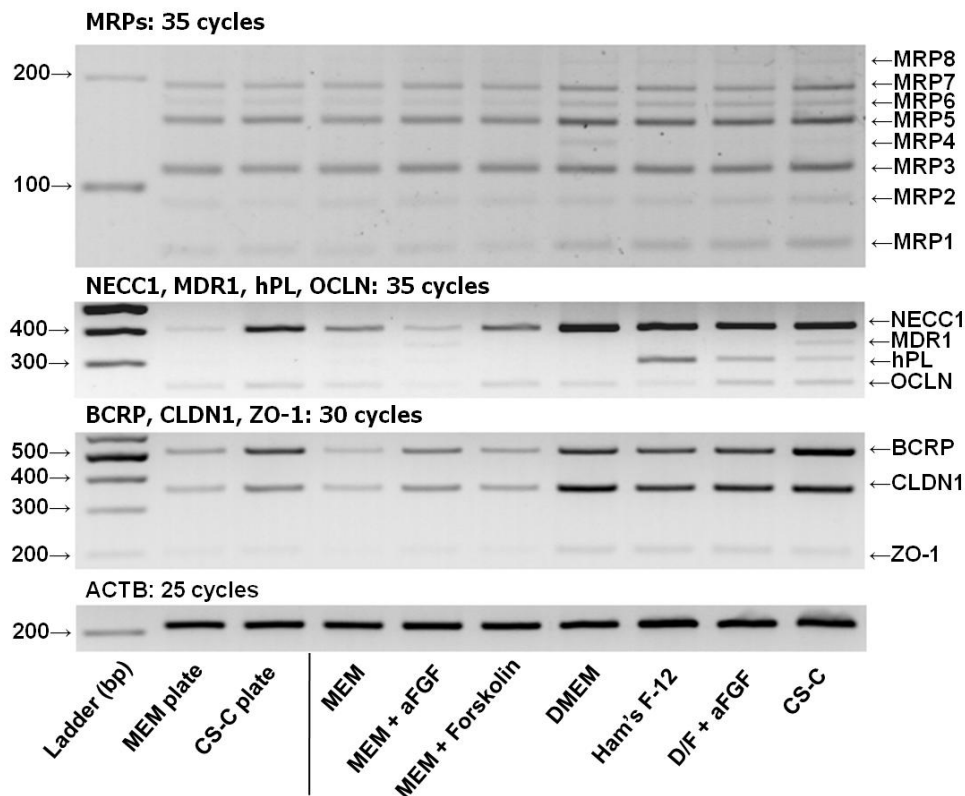


Fig. 15. The expression profiles of MRPs, NECC1 (product size, 402 bp), MDR1 (349 bp), hPL (301 bp), BCRP (501 bp), OCLN (248 bp), CLDN1 (350 bp), ZO-1 (198 bp), and ACTB (210 bp) mRNAs of the JEG-3 cells cultured in 24-well plates (left-hand two columns) and on Millicell[®] 24-well cell culture inserts (right-hand seven columns) using multiplex RT-PCR method. The cells were cultured under each condition for 4 d after initially culturing in MEM for 3 d. Left-hand numbers indicate the size of the PCR products (bp). Right-hand letters indicate the position of each target gene. The detail of multiplex RT-PCR method was described in “materials and methods”. Data shown a representative of triplicate experiments. ACTB was investigated as a control for total mRNA amounts.

れており^{48,78,79)}, 本結果は DJEG 細胞層の TJ 形成能に関するシンシチオトロホブラスト化, および前章における DJEG 細胞層の TEER 値上昇を裏付けるものである. また, 発現変動の大きかった分化指標について, より詳細に定量的 TaqMan[®] realtime RT-PCR 法で定量したところ (Fig. 16), NECC1, BCRP, および CLDN1 については DJEG 細胞で有意に発現誘導が認められ, multiplex RT-PCR による結果をさらに裏付けることができた. DJEG 細胞における定量的 TaqMan[®] realtime RT-PCR 法による hPL の発現は検出できなかったが multiplex RT-PCR 法により発現誘導は確認されており, PCR 条件の設定によって検出できる可能性は残されている. 十分な TEER 値を得ることはできなかった Ham's F-12 培地においても hPL の発現誘導が認められたが, 薬物透過モデルに用いる細胞層としてはまず細胞間隙透過をより抑制しており, かつシンシチオトロホブラスト様の分化指標の亢進を認める DJEG 細胞層が妥当であると考えられる.

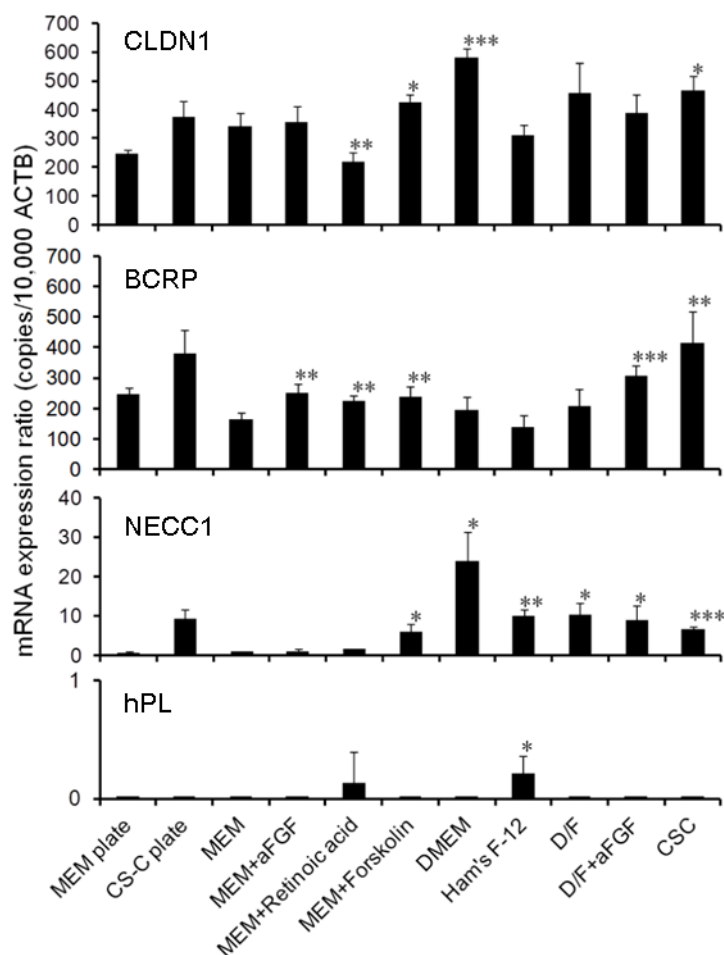


Fig. 16. Comparison of the expression ratios of CLDN1, BCRP, NECC1, and hPL mRNAs under different JEG-3 culture conditions determined using the TaqMan[®] realtime RT-PCR method. The JEG-3 cells were cultured on Millicell[®] 24-well cell culture inserts for 4 d after initially culturing in MEM for 3 d. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Student's t-test vs. MEM, $n = 4$).

また, BCRP については培養液交換時の JEG-3 細胞(M3 細胞, MEM 培養 3 日目の JEG-3 細胞)をコントロールとして, MEM 培養 7 日目の JEG-3 (NJEG)細胞と MEM 培養 3 日に加えて CSC[®]

培地による培養 4 日目の JEG-3 (DJEG)細胞において、その蛋白発現レベルを比較検討した(Fig. 17). これにより、蛋白発現レベルにおいても BCRP は DJEG 細胞で誘導されていることが示された. また、MDR1 mRNA 発現レベルについては、DJEG 細胞での微弱な発現誘導が認められた(Fig. 15). MDR1 は、シンシチオトロホプラストにおいて発現が抑制されるとの報告があるが消失すると

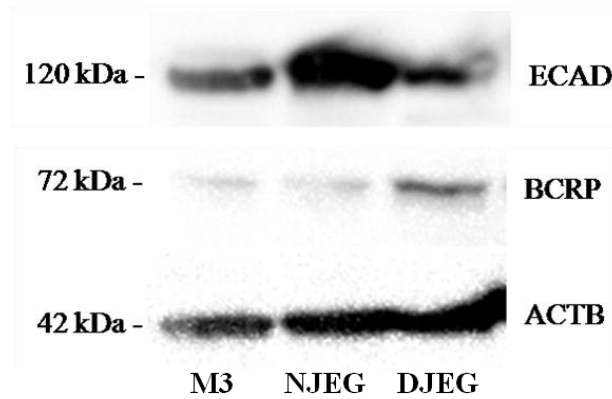


Fig. 17. Difference between NJEG and DJEG cells with respect to ECAD and BCRP protein expressions investigated using the western blotting. The cells were cultured under three conditions: for 3 d in MEM (M3), 4 d in MEM (NJEG), and 4 d in CS-C[®] after initial culture in MEM for 3 d (DJEG). Numbers on the left indicate the size of the target proteins. Letters on the right indicate the name of each target protein. Data shown a representative of the triplicate experiments. The ACTB protein was investigated as a control of total protein amounts.

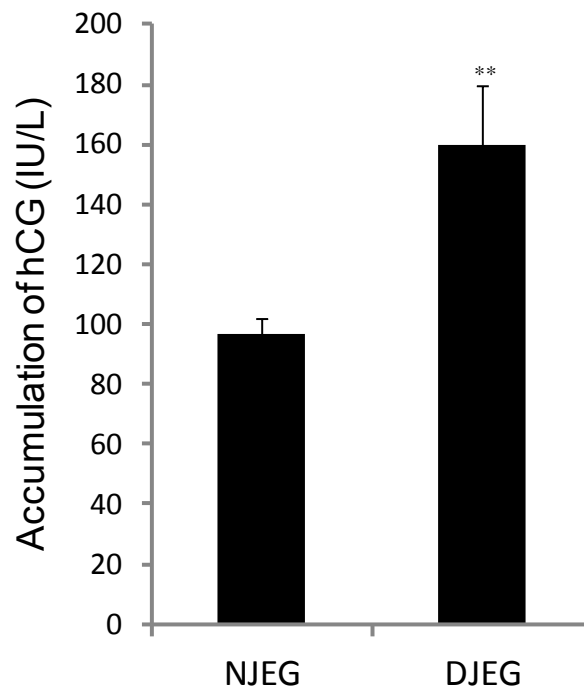


Fig. 18. Secretion amount of hCG for 3 days from JEG cells cultured in MEM (NJEG) and CSC[®] (DJEG). Human chorionic gonadotropin (hCG) secretion was measured after the collection of each supernatant. ** $p < 0.01$ compared with MEM (Student's t -test). Data points represent the mean \pm SD values of at least 4 different layers.

いう報告はなく、より詳細な検討が必要ではあるものの DJEG 細胞における MDR1 の微弱な発現誘導も、シンシチオトロホブラスト様である可能性が考えられた。また、シンシチオトロホブラスト化において亢進する、hCG の分泌特性を NJEG 細胞と DJEG 細胞間で比較検討した (Fig. 18)。その結果、hCG の分泌は DJEG 細胞において促進されており、これについてもシンシチオトロホブラスト様分化指標が亢進していることが示された。これら、シンシチオトロホブラスト様分化指標発現レベルの比較検討によって、DJEG 細胞は NJEG 細胞に比べてよりシンシチオトロホブラスト様の分化を行っている可能性が強く示唆された。

さらに、MRPs mRNA 発現プロファイルを確認したところ (Fig. 15)、DJEG 細胞では NJEG 細胞に比べて MRP1,3,5,7 に発現誘導の傾向が認められ、中でも MRP5 の発現誘導が最も高レベルであった。既報のシンシチオトロホブラストにおける MRPs 発現プロファイルでは⁶⁸⁾、MRP1,2,5,7 の発現レベルが比較的高レベルである。本結果における DJEG 細胞の MRPs mRNA 発現プロファイルは、既報のシンシチオトロホブラストのプロファイルとは、MRP2,3 について一致していないものの、他の MRPs の発現プロファイルは類似していることを示した。これにより、本 DJEG 細胞層モデルが、大部分の MRPs 排出機能を反映できる可能性を有することが判明した。

また、シンシチオトロホブラスト様細胞融合能獲得の指標となりうる ECAD と CAD-11 について、NJEG 細胞層と DJEG 細胞層間での蛋白発現レベルを比較検討した。DJEG 細胞において MEM 培養 3 日目の JEG-3 (M3)、NJEG 細胞、および DJEG 細胞において、ECAD の蛋白発現レベルを比較検討したところ (Fig. 17)、MEM 培養 3 日目の JEG-3 よりも培養 7 日目の NJEG 細胞の方が ECAD の蛋白発現が誘導されたが DJEG 細胞では誘導されなかった。CAD-11 については、NJEG 細胞と DJEG 細胞のいずれにおいても今回のウェスタンブロッティングの条件では検出できなかった (データ未掲載)。本結果より、少なくとも DJEG 細胞においてシンシチオトロホブラスト様である細胞融合に伴う ECAD の蛋白発現の減弱が認められ、前節において示されたシンシチオトロホブラスト様の鏡検像に加えてシンシチオトロホブラスト化の特徴である融合能獲得の可能性は高いことをさらに示唆した。

一方、TEER 値に関して DJEG 細胞層に及ばなかった他の培養条件でも、いくつかのシンシチオトロホブラスト様分化指標の亢進を認めたものはあったが (Fig. 15, 16)、hPL、NECC1、および BCRP 発現誘導がすべて認められたものは、CSC[®]培地とこれに培地組成が類似している D/F + aFGF のみであった。*In vitro* 胎盤薬物透過モデルとしては、できる限りシンシチオトロホブラスト類似性を表現していること望ましいが、中でも物質透過モデルとして備えているべき指標は、細胞層の TEER 値とシンシチオトロホブラストにおいて高レベルの発現が認められる BCRP の発現誘導である^{4,74,75)}。この観点から、CLDN1、NECC1 の発現誘導が認められた DMEM 培地や、hPL の発現誘導が認められた Ham's F-12 培地による JEG-3 培養では、経細胞輸送を評価できる TEER 値を得ることや BCRP 基質の胎盤関門透過性を評価することは困難であり、胎盤関門の物質透過を

評価するモデルには高い TEER 値が得られた上で, hPL, NECC1 などの分化指標の亢進, および高レベルの BCRP 発現誘導がすべて認められた CSC[®]培地またはこれに培地組成が類似している D/F + aFGF 培地が妥当であると考えられる. さらに, CSC[®]培地と D/F + aFGF 培地を比較しても BCRP の発現レベルは CSC[®]培地の方が高レベルであり, 本節の結果は, CSC[®]培地が胎盤薬物透過評価モデル細胞層として最も妥当であることを裏付けるものであった.

本節では, まずはシンシチオトロホブラスト様分化指標の発現レベル解析を行い, DJEG 細胞の hPL, hCG, NECC1, BCRP, MDR1, MRPs, CLDN1, および ECAD に関する発現プロファイルが, NJEG 細胞よりシンシチオトロホブラスト様であることが認められ, DJEG 細胞層がシンシチオトロホブラスト様の表現型を多く有していることが明白となった. さらにシンシチオトロホブラストに類似した efflux トランスポーターが発現していることが認められ, DJEG 細胞層モデルにトランスポーターを介した胎盤関門薬物透過を正確に評価できる可能性があることが示された.

第三節 小括

本章では, 胎盤関門の経細胞輸送を評価出来る可能性のあるモデルとして, DJEG 細胞層モデルを用いて, さらにシンシチオトロホブラスト類似性を検証した. 胎盤関門モデルは, シンシチオトロホブラスト類似性が高いほどその薬物透過を正確に評価できると考えられる. シンシチオトロホブラスト様の分化指標には, hCG や hPL などの妊娠時に亢進するホルモン分泌, ヒト絨毛癌細胞株にはほとんど発現が認められていない NECC1 の発現誘導, efflux トランスポーターの発現プロファイルの類似性, 細胞融合能の獲得などがある. これらの分化指標の解析は, DJEG 細胞層が胎盤関門モデルとして妥当であることを確認するための有力な手段である.

本章の結果により, CSC[®]培地によって培養した本 DJEG 細胞層はシンシチオトロホブラスト様ホルモン分泌の亢進として, hCG の分泌能の亢進と hPL mRNA の発現誘導が認められた. また, NECC1 の発現誘導も認められ, シンシチオトロホブラスト様の分化を行っていることが強く示唆された. さらに, BCRP の高レベルの発現誘導および MDR1, MRPs mRNA 発現プロファイルのシンシチオトロホブラスト類似性も確認され, 本 DJEG 細胞層モデルが efflux トランスポーターを介した担体輸送を含めた, 胎盤関門の経細胞輸送を評価できる可能性があることが判明した. また, TJ 関連蛋白の mRNA 発現誘導, および ECAD の発現減弱と CAD-11 の発現誘導をともなった細胞融合能の獲得傾向が認められ, DJEG 細胞層がシンシチオトロホブラスト様の機能を獲得して TEER 値を上昇させていることが示唆された. これら, DJEG 細胞におけるシンシチオトロホブラスト様分化指標の解析結果を, シンシチオトロホブラストにおける報告および NJEG 細胞と比較して Table 2 に示した.

Table 2. Simplified summary of a comparison between the characterization of syncytiotrophoblast reported previously, NJEGs, and DJEGs.

Characterizations	Syncytiotrophoblasts (as reported previously)	NJEGs in our study	DJEGs in our study
Secretion of hCG	Induced	Mildly secreted	Induced
Expression of hPL	Induced	Not detected	Mildly induced
Expression of NECC1	Temporarily induced	Not detected	Induced
Expression of BCRP	Strongly induced	Mildly induced	Strongly induced
Expression of MDR1	Reduced	Not detected	Not detected
Induction of MRPs	MRP1, 2, 5, 7	Mildly expressed	MRP1, 3, 5, 7
Expression of CLDN1	Induced	Mildly expressed	Induced
Expression of ECAD	Reduced	Strongly induced	Reduced
Expression of CAD-11	Induced	Not detected	Mildly induced
Fusion ability	Fusogenic	Non-fusogenic	Mildly fusogenic

シンシチオトロホブラスト様分化指標の解析において、本 DJEG 細胞層モデルは NJEG 細胞層に比べて明らかにシンシチオトロホブラスト類似性を示し、NJEG 細胞から DJEG 細胞に分化するにあたってシンシチオトロホブラスト化の過程をたどっていることが強く示唆された。これらのシンシチオトロホブラスト類似性を維持したまま、経細胞輸送を評価出来る可能性を持った *in vitro* 胎盤関門薬物透過評価モデルは、これまでに全く報告例が無く、本 DJEG 細胞層モデルは、現段階では最も胎盤関門薬物透過評価モデルに妥当であることが判明した。

一方、いくつかの問題点も明らかとなり、まず DJEG 細胞の MRPs mRNA 発現プロファイルは MRP2,3 においてシンシチオトロホブラスト類似性を認めなかった。MRP2,3 の基質薬物の代表的なものには、ビンブラスチンやエトポシドなどが報告されている⁶⁸⁾。本 DJEG 細胞層において、これらのトランスポーター基質薬物の透過性評価を行う場合には、評価値への影響の程度を今後詳細に検証しておく必要がある。また、DJEG 細胞においてシンシチオトロホブラスト細胞融合にともなう CAD-11 の発現誘導が微弱であった。Evseenko らは⁴⁾、サイトトロホブラストのシンシチオトロホブラスト化に向けた培養条件において、培養液にインスリンを添加した。このような知見を基に、さらに培養条件を検討していくことで、DJEG 細胞層が、さらにシンシチオトロホブラスト様の細胞融合能を獲得できる可能性は残されている。さらに、DJEG 細胞層の複層性に関しては、前述のとお

り、本 DJEG 細胞層モデルが胎盤関門を反映した複層モデルを示している可能性を検証するとともに、より単純系を目指してシンシチオトロホブラスト層単層膜の作製条件の検討も有用な課題である。また、胎盤関門に発現しているトランスポーター群の一部は、その局在性が報告されており^{6,69,70,82,84)}、より胎盤関門薬物透過モデルとしての妥当性を検証するために、今後詳細に DJEG 細胞層におけるこれらの局在性を解明していくことも検討課題と考えられる。

以上のような検討課題は残るものの、これまでの結果から本 DJEG 細胞層モデルは、現段階では極めてシンシチオトロホブラスト層に類似した *in vitro* 胎盤薬物透過評価モデルであると言える。また、担体輸送を担う efflux トランスポーター BCRP と MRPs の発現が確認できていることで、まずは本モデルにおいてこれらのトランスポーターを介した経細胞輸送の透過評価も行える可能性が示された。さらに、シンシチオトロホブラストに発現しているトランスポーター群の機能を DJEG 細胞層が反映していれば、胎盤関門の薬物透過を予測できる *in vitro* 評価系として利用できることが示される。次章では、本 DJEG 細胞層モデルを介した基質薬物の透過性を評価し、実際に DJEG 細胞層モデルが胎盤関門透過機能を反映できる可能性を検証した。

第三章 DJEG 胎盤薬物透過モデルの透過機能解析と有用性の評価

胎盤関門の薬物透過性は、主に経細胞輸送経路を介して薬物の分子量や、脂溶性などの物性、およびトランスポーターなどの担体輸送によって決定される。 *In vitro* 胎盤関門薬物透過評価モデルの確立に向けては、最終的にその薬物透過性がシンシチオトロホブラスト様である必要がある。そのためにはシンシチオトロホブラストに備わっているトランスポーターが、本 DJEG 細胞層モデルにおいても機能していることが必要である。前章で既に、*efflux* トランスポーターに関して DJEG 細胞層でのシンシチオトロホブラスト様発現プロファイルを確認した。さらに本章では、本 DJEG 細胞層モデルを介したこれらのトランスポーター基質薬物の透過特性が、シンシチオトロホブラスト様であることを検証し、*in vitro* 胎盤薬物透過評価モデルとしての妥当性評価を行った。最後に、3 種の睡眠導入剤について本モデルを用いた薬物透過性を評価し、その胎児移行性を予測することを試みた。

第一節 トランスポーター基質薬物を用いた DJEG 胎盤薬物透過モデルの透過機能解析

まず、前章において BCRP の高い発現レベルが確認された本 DJEG 細胞層モデルにおいて、さらに BCRP が機能していることが明らかとなれば、胎盤関門の主な異物排出機能を反映できるモデルであることが判明する。ヒトと同様にラット胎盤でも BCRP の発現レベルは高いことが知られており、ラット胎盤を介したシメチジンの輸送は胎児側から母体側への輸送が促進的であり、この促進的な母体側への輸送は BCRP 阻害剤によって制限されることが報告されている⁸⁵⁾。また Pavek らは⁸⁶⁾、ヒト BCRP を遺伝子導入したイヌ腎上皮由来 MDCKII 細胞を用いて、シメチジンの細胞内取り込みが BCRP 阻害剤によって明らかに促進することを報告し、ヒトにおいてもシメチジンが BCRP 基質薬物のひとつであることを示した。また、シメチジンはヒト胎盤において代謝を受けないこと⁸⁷⁾、受動拡散による生体膜輸送が低レベルであること⁸⁶⁾、および MDR1 の基質ではないことが知られており⁸⁵⁾、胎盤を介した BCRP の機能評価に適切な基質薬物である。したがって、本節ではまず本 DJEG 細胞層モデルが BCRP による排出機能を反映できることを明らかにするために、DJEG 細胞層を介したシメチジンの透過特性を検討し、DJEG 細胞層が *efflux* トランスポーターによる透過特性を示すことを検証した。

次に、より DJEG 細胞層の胎盤薬物透過モデルとしての妥当性を検証するために、他の *efflux* トランスポーター群 MRPs についても本 DJEG 細胞層モデルにおける透過機能評価を行った。フルオレセインは MRPs の基質薬物であること、またプロベネシドはそれらの阻害剤であることが知られている^{66,88-90)}。そこで、本 DJEG 細胞層モデルが MRPs の排出機能特性を反映しうることをプロベネシド処理および無処理の DJEG 細胞層モデル間で比較し、フルオレセインの DJEG 細胞層を

介した透過特性を評価した。

さらに、本 DJEG 細胞層モデルにおいて、シンシチオトロホブラストが有する influx トランスポーターに関しても透過機能評価を行った。バルプロ酸は妊娠時の薬物療法において催奇形性の報告があり、その使用には細心の注意を払う必要がある。また、バルプロ酸の胎児移行性は高いことが知られており^{91,92)}、この要因には低分子量、脂溶性に加えて influx トランスポーターであるモノカルボン酸トランスポーター(MCT)による担体輸送の関与などが報告されている^{20,21,93-97)}。さらには、バルプロ酸の胎児移行性報告はヒトでの試験結果も報告されており、18 名の妊婦によるヒトにおけるバルプロ酸の胎児移行性の報告では胎児血／母体血比(F/M 比)が 1.38 と高値を示した⁹²⁾。これらの知見から、バルプロ酸は受動拡散と MCT を介して胎盤関門の高い透過性を示すことが判明している。これらの報告に基づいて、本 DJEG 細胞層モデルが胎盤関門の透過機能を備えていることをさらに検証するため、バルプロ酸の高い胎盤透過性を反映しうることを検証した。

本節では、これら DJEG 細胞層の透過機能評価を行うことで、本 DJEG 細胞層モデルが細胞特性のシンシチオトロホブラスト類似性に加えて、胎盤関門の透過機能を反映できることを検証することに取り組んだ。

実験材料と方法

(1) シメチジン透過実験

透過実験の準備として、ミリセル[®]を用いて作製した NJEG 細胞層および DJEG 細胞層の培養液を 4.5 g/L D-グルコース含有 Hank's balanced salt solution (HBSS) で置換し、30 分間インキュベートして細胞層を安定化させた。最終濃度 10~300 μM のシメチジン(wt. 252, LogP = 0.072)を上層または下層に添加し、37°C で 60 分間の透過実験を行い、上層または下層のシメチジン濃度を high performance liquid chromatography (HPLC) を用いて定量した。透過速度(J)および非線形回帰は式 2 を用いて Sigma Stat[®]により解析した。

$$\text{式 2: } J = \frac{dQ/dT}{A} \quad J = J_{\max} \times \frac{C_0}{K_m + C_0} + N_s \cdot C_0$$

J : permeation rate ($\text{nmol}/\text{cm}^2 \cdot \text{s}$), N_s : non-saturable constant, K_m : michaelis constant, J_{\max} : maximum permeation rate.

(2) HPLC を用いたシメチジンの定量

HPLC 条件は、流速 1 mL/分、移動相(2 mM トリエチルアミン含有 25 mM 酢酸 : アセトニトリル = 20 : 80)、カラム(Cosmosil, ナカライテスク, 150 × 2.1 mm, 5 μm , 10 Å)、検出 UV 228 nm で行い^{98,99)}、リテンションタイム、6.1 分であった。

(3) フルオレセインの透過実験

透過実験の準備を行った DJEG 細胞層を用いて最終濃度 15 μ M のフルオレセイン(wt. 332, LogP = 2.66)および MRPs の阻害剤 probenecid 100 μ M を上層に添加し, 37°C で 60 分間の透過実験を行った. 下層から 10 μ L を採取し, 190 μ L の HBSS で希釈した後, フルオレセインを蛍光光度計(excitation 485 nm, emission 528 nm)で定量した.

(4) バルプロ酸の透過実験

透過実験の準備を行った DJEG 細胞層を用いて最終濃度 125~2000 μ M のバルプロ酸(wt. 144, LogP = 2.58)を上層または下層に添加し, 37°C で 60 分間の透過実験を行った. 上層または下層から 10 μ L を採取し, 190 μ L の HBSS で希釈した後, VIVA-E 免疫比濁測定装置 (デイドベアリング)により, エミット[®]2000 バルプロ酸アッセイを用いて定量した.

実験結果および考察

BCRP は, 母体側に局在している efflux トランスポーターである. まず, 本 DJEG 細胞層モデルにより, 母体側である apical (A) 側から胎児側である basolateral (B) 側へのシメチジンの透過 (A to B) 係数と, 逆方向の透過 (B to A) 係数を比較した. NJEG 細胞層では両方向の透過性に顕著な相違を示さなかったが, DJEG 細胞層では B to A の透過が有意に高いことが示された(Fig. 19).

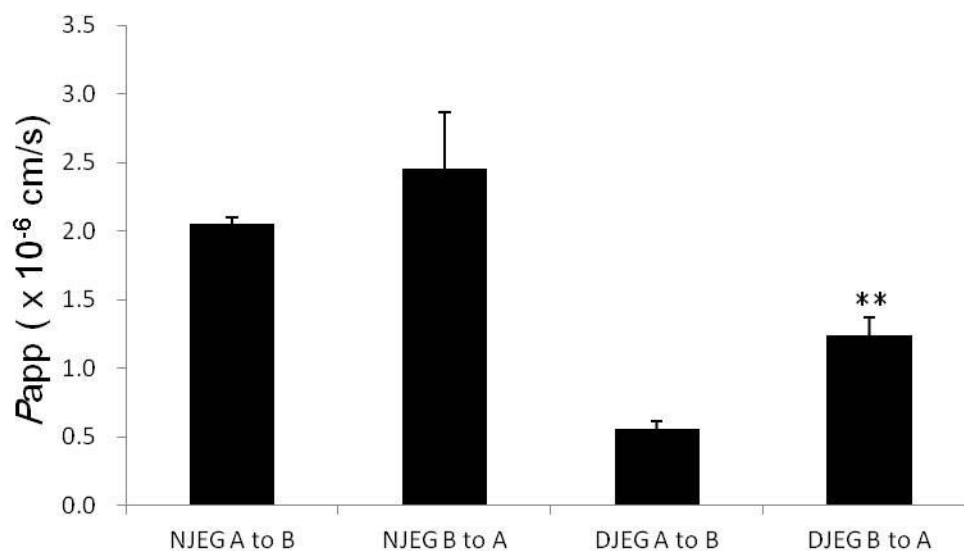


Fig. 19. Apparent permeability coefficient (P_{app}) of cimetidine (30 μ M) across NJEG and DJEG layers both apical side to basolateral side (A to B) and basolateral to apical (B to A). Permeation studies were carried out for 60 minutes. ** $p < 0.01$ vs DJEG A to B.

シメチジンの A to B 透過性は, BCRP の排出機能によって B to A 透過性よりも低くなったと考えられ, 本結果により本 DJEG 細胞層モデルが, BCRP による排出機能を反映していることが示唆され

た.

また, DJEG 細胞層における両方向のシメチジンの濃度依存的透過性を検討したところ(Fig. 20), 排出方向 B to A のシメチジン透過は濃度依存的な飽和性を示し, K_m 値 $19.8 \mu\text{M}$ をとる Michaelis-menten 型の飽和曲線に適合する成分と線形性の成分の和で回帰することができた. 本結果により, 本 DJEG 細胞層モデルによるシメチジンの透過特性には, 明かな efflux トランスポーターを介した透過特性が認められ, 本 DJEG 細胞層モデルが BCRP の排出機能を反映できることを強く示唆した.

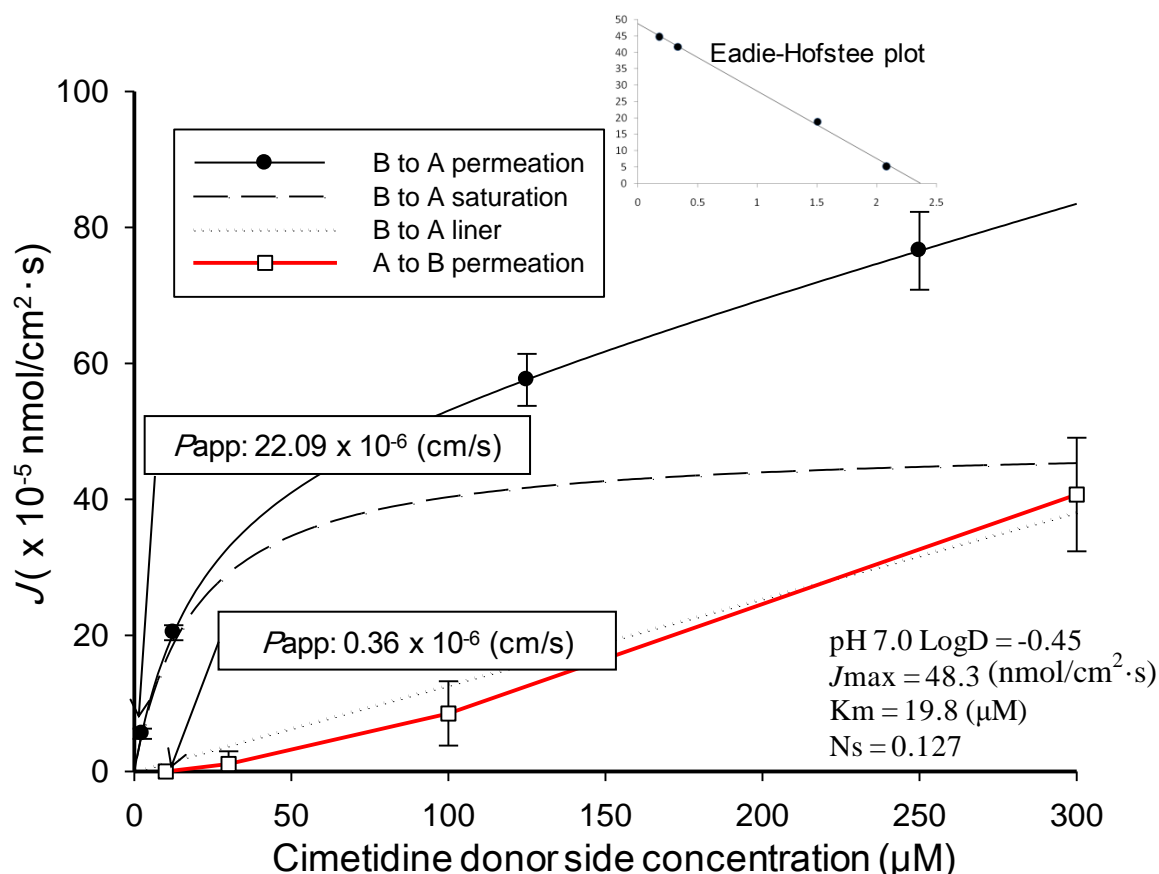


Fig. 20. Concentration dependent permeation rate (J) of cimetidine across DJEG layers both apical side to basolateral side (A to B) and basolateral to apical (B to A). Apparent permeability coefficients indicate the values in clinical cimetidine concentrations. K_m : Michaelis constant, N_s : Non-saturable constant. Eadie-Hofstee plot indicates the saturable component.

Johnston らは¹⁰⁰⁾, シメチジンを投与された 62 名の妊婦から母体血と臍帯血を採取して, シメチジンの F/M 比が約 0.5 であることを報告し, ヒトにおいてもシメチジンは母体血側へ能動的に排出されることが示された. 一方 Staud らは⁸⁵⁾, ラット胎盤を介した胎児側と母体側の 2 層灌流モデルによって, シメチジンの BCRP を介した両方向透過性を評価し, 胎児側から母体側への透過速度が, K_m 値 $16.7 \mu\text{M}$ をとる濃度依存的な飽和性を示すことを報告した. このとき, シメチジン F/M 比は約 0.5 で平衡したが, BCRP 阻害剤処理することで F/M 比は 1 に近づいた. 既に, シメチジンが

ヒト BCRP の基質であることは明らかとされており⁸⁶⁾, 前述のヒトにおけるシメチジンの母体側への能動的な排出も, BCRP によって担われている可能性は非常に高い. したがって, DJEG 細胞層のシメチジン透過特性は, BCRP の排出機能を反映している可能性が高く, 本 DJEG 細胞層モデルが胎盤関門の主な異物排出機能を反映できるモデルであることを強く示唆した.

また, 前述の報告からヒトとラットにおけるシメチジンの F/M 比試験の報告は同等であることが示されており, 本 DJEG 細胞層とラットにおける BCRP を介したシメチジン透過の K_m 値も同レベルの結果が得られている. 今後, さらにヒト細胞による K_m 値の検討の余地はあるが, 本 DJEG 細胞層モデルにおけるシメチジンの透過パラメーター K_m 値が, ヒトと同等の F/M 比を示すラット BCRP を介したシメチジン透過パラメーターと同レベルであることは, 本 DJEG 細胞層モデルがヒト BCRP 機能を反映していることを一部裏付けるものである.

一方, *in vitro* 細胞層モデルを用いた物質透過の評価では, まず均一な細胞層の形成が重要な点であるが, *in vivo* と比較することで最終的に良好な相関性を得ることを目指さねばならない. 第一章で述べたが小腸における薬物吸収のモデルである Caco-2 細胞層モデルの例では, TEER 値が $300 \text{ ohms} \cdot \text{cm}^2$ に達することで, 小腸上皮細胞層との良好な薬物輸送の相関性を得ることができる. *In vivo* における TEER 値は明白となっていないが, 小腸上皮細胞層と良好な相関性を得た Caco-2 細胞層では, 物質透過の絶対値そのものは *in vivo* よりも抑えられていることが知られている. 本モデルを用いたシメチジンの透過性評価では, 有効血中濃度域における 60 分間の透過実験において, 母体側薬物量の約 100 分の 1 が胎児側へ移行すると予測された. 摘出満期胎盤を用いた *ex vivo* モデルを用いた報告では, 有効血中濃度域での母体側から胎児側への 60 分間のシメチジン透過は, 母体側薬物量の約 100 分の 4 と予測されている⁸⁴⁾. 本 DJEG 細胞層モデルは, 少なくとも満期胎盤を用いた *ex vivo* と同レベルの物質透過に対するバリア能を有していると考えられ, 今後 *in vivo* データとの相関性を検証していくための適正なモデルであると期待できる.

次に, 本 DJEG 細胞層モデルによって MRPs の基質であるフルオレセインの透過特性を評価したところ, プロベネシドを作用させて MRPs の機能を制限すると, DJEG 細胞層を介したフルオレセインの透過係数は有意に高くなることが示された(Fig. 21). 本結果は, MRPs の排出機能がプロベネシドによって抑えられ, A to B のフルオレセイン透過時に機能していた MRPs による A 側への排出が抑制されることにより, B 側への透過量が増加したと考えられた. しかしながら, フルオレセインが MRPs の基質であることはいくつか報告されているものの, 全ての MRPs の apical 側と basolateral 側への局在は未だ明確にされておらず, フルオレセインと MRPs サブタイプ間の親和性も未知である. 現在, 少なくともフルオレセインは MRP1 と MRP2 の基質であり, プロベネシドはこれらを阻害することが報告されている^{66,88-90,101)}. 前章で確認されたとおり, 本 DJEG 細胞層モデルにおける MRP1 と MRP2 の発現レベルは低レベルであった. 本結果において示された, プロベネシドの MRPs 阻害に起因するフルオレセインの A to B 透過係数の増大は, 有意差を認めたもの

のわずかであった。本結果は, apical 側に局在している報告のある MRP2 の発現が本モデルでは低レベルであり, 受動拡散の寄与が大きいことに起因している可能性が有る。したがって, DJEG 細胞層を介したフルオレセインの透過が MRPs 排出機能の反映を一部示したものと考えられるが, 他の MRPs 基質や阻害剤による検討を含めて, さらに MRPs を介した透過機能特性を検証することなど, 今後の課題も残っている。

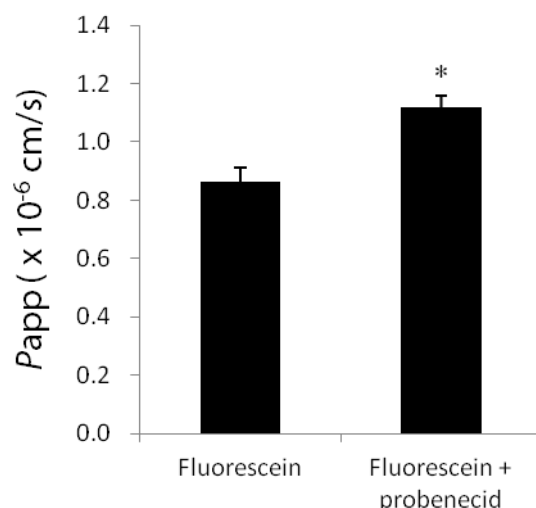


Fig. 21. Effect of Probenecid (100 μ M) on the fluorescein (15 μ M) apparent permeability coefficient across the DJEG layers (A to B). * $p < 0.05$.

さらに, 本 DJEG 細胞層モデルにおけるバルプロ酸の透過性評価を行なったところ, 有効血中濃度域(500 μ M 付近)において A to B 方向の透過性が有意に高く, 本モデルがバルプロ酸の高い胎児移行性を反映していることを示唆した。また, A to B 方向のバルプロ酸透過性は, influx トランスポーターの流入透過機能を反映したと考えられる飽和性が認められ, Michaelis-menten 型の飽和曲線に適合する成分の Km 値は 1.76 mM であった(Fig. 22)。Ushigome らと Utoguchi らによる BeWo 細胞^{20,21)}, および Nakamura らによるヒトシンシチオトロホブラスト膜小胞を用いた⁹⁶⁾, バルプロ酸の MCT による細胞内取り込み実験の報告によれば, その Km 値はそれぞれ 11.4 mM, 0.2 mM, 1.04 mM であった。これらの報告の中でも, 本節における結果は, よりヒトシンシチオトロホブラストと同レベルであり, DJEG 細胞層のバルプロ酸 A to B 透過性において認められた飽和性は, シンシチオトロホブラストに発現している MCT を介した透過機能が反映されていることを強く示唆した。

また, バルプロ酸は低分子量の脂溶性物質であり, 受動拡散の寄与が大きいと考えられている。本結果においても線形性の A to B 透過成分の寄与が大きく, バルプロ酸における受動拡散の寄与率の高さを示したものと考えられる。本研究では, DJEG 細胞における influx トランスポーターの発現を検討していないが, バルプロ酸の透過性評価から, MCT も発現していることが予測され, 本モデルにおいて, influx トランスポーターを介した薬物透過の比較評価もできる可能性が示された。

ここまで、本 DJEG 細胞層モデルが経細胞輸送を評価できる可能性の面で既存の BeWo 細胞層や NJEG 細胞層モデルに比較してより適切であり、細胞特性や efflux トランスポーターに関連する mRNA および蛋白の発現プロファイル、胎盤関門の主要層であるシンシチオトロホブラスト層に極めて類似していることを示してきた。さらに、本節では DJEG 細胞層モデルが、シンシチオトロホブラストに発現している主なトランスポーターである、BCRP, MRPs, および MCT を介した経細胞輸送においても、シンシチオトロホブラスト層様の透過機能特性を示すことを明らかにした。これらの結果によって、本 DJEG 細胞層モデルが現段階では最も薬物胎児移行評価系に適う胎盤関門薬物透過評価モデルであることが強く示唆された。そこで次に、本 DJEG 細胞層モデルを用いていくつかの医薬品の *in vitro* 胎盤関門薬物透過評価を行い、胎児移行性を予測することを試みた。

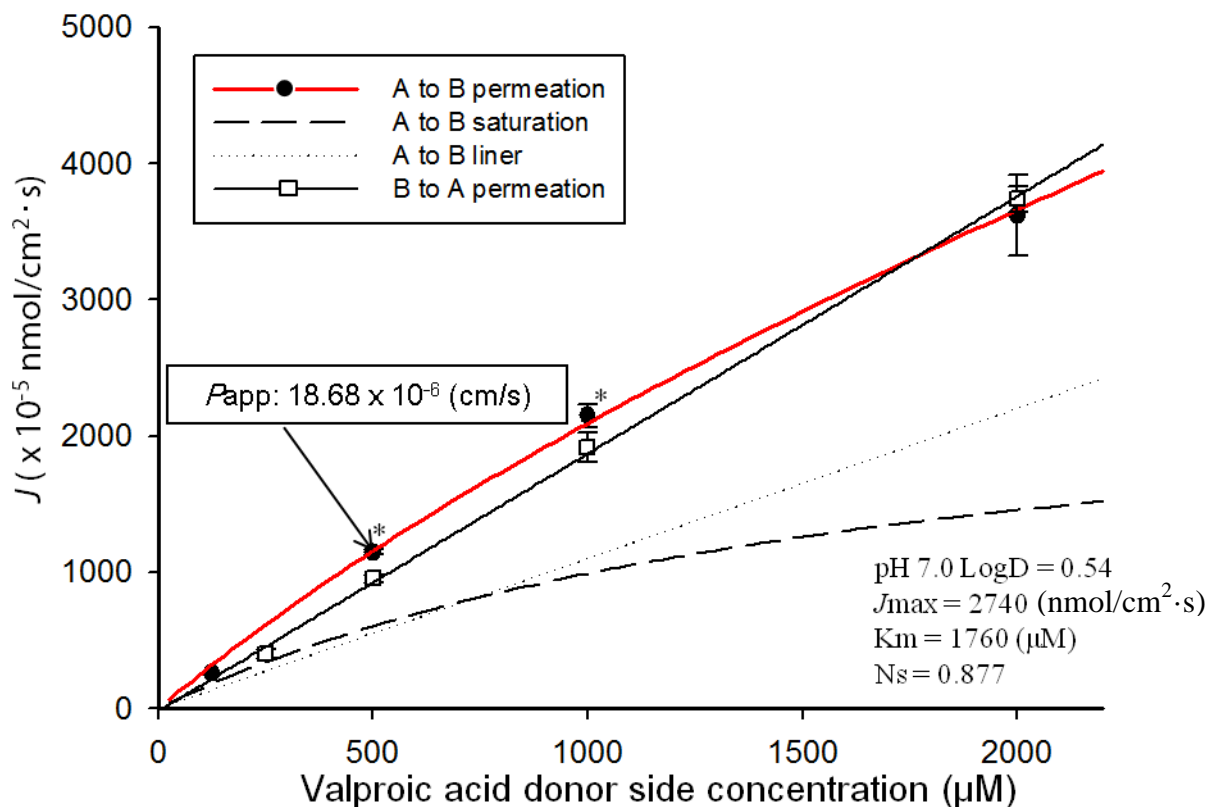


Fig. 22. Concentration dependent permeation rate (J) of valproic acid across DJEG layers from apical side to basolateral side (A to B) for 60 minutes. Apparent permeability coefficient indicates the value in clinical valproic acid concentration. K_m : Michaelis constant, N_s : Non-saturable constant. $*p < 0.05$.

第二節 DJEG 胎盤薬物透過モデルによる睡眠導入剤の胎盤関門透過性予測

妊娠時に使用される可能性が高く、かつ主に胎児安全性情報が不足している医薬品を使用

せざるを得ない疾患領域の妊娠時薬物療法では、適切な医薬品の選択を行い難いために¹⁰²⁻¹⁰⁴⁾、本 DJEG 細胞層モデルを用いて比較評価された医薬品の胎児移行性情報が、臨床応用に向けて実に有益な情報となり得る。これらの疾患領域で用いられる医薬品群のひとつに睡眠導入剤があり、本節ではブロチゾラム、トリアゾラム、ゾピクロンの比較評価を行った。医薬品の胎児危険度分類のひとつに FDA 分類があるが、これを基にして胎児安全性情報を纏めているデータベースのひとつに Drugs in Pregnancy and Lactation (DPL)がある⁹¹⁾。DPL は現状では医薬品の胎児安全性情報としての情報量が比較的多いために、DPL 評価と称されて世界的に利用されている。ブロチゾラムとゾピクロンに関する情報はこの DPL にも記載されておらず、トリアゾラムの胎児移行性は他の同種同効薬(ジアゼパム)を参照のことで記載されている。しかしながら、同種同効薬では、薬理作用の同等性から胎児毒性が同等である可能性はあるが、薬物の物性などに依存する医薬品の胎児移行性が必ずしも同等であるとは言えない。

そこで、本節では、本 DJEG 細胞層モデルを用いて、ブロチゾラム、トリアゾラム、およびゾピクロンの透過性比較評価を行い、これらの胎児移行性の予測を試みた。

実験材料と方法

(1) 3 種の睡眠導入剤の透過実験

透過実験の準備を行った DJEG 細胞層を用いて最終濃度 10 μ M のブロチゾラム(Bz: w.t. 394, LogP 2.34), トリアゾラム(Tz: w.t. 343, LogP 2.66), ゾピクロン(Zc: w.t. 389, LogP 2.53)を上層に添加し、37°C で 60 分間の透過実験を行った。下層から 200~500 μ L のサンプルを採取し、固相抽出した後、液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析装置(LC/MS/MS)で定量した¹⁰⁵⁻¹⁰⁷⁾。3 種混合透過実験では、上層にそれぞれ最終濃度 10 μ M で Bz, Tz, Zc を混合添加して同様に透過実験を行い、下層に透過した 3 種の薬物量を LC/MS/MS で定量した。

(2) 3 種の睡眠導入剤の定量

固相抽出カラム Sep-Pak[®] Vac C-8 (Waters)をメタノール 1 mL で平衡化し、蒸留水 1 mL でメタノールを除去した後、カラムにサンプルをアプライした。蒸留水 5 mL で洗浄した後、アセトニトリル 1 mL で溶出し、終濃度 5 ng/mL の内部標準物質(Paroxetine-D₆)とともに LC/MS/MS にアプライした。HPLC システムは、SLC-A10 (Shimadzu)を用い、カラム 5C₁₈-MS-II (Waters, 50 \times 2 mm)により、移動相、蟻酸アンモニウム緩衝液 (pH 3.0; 2 mM):アセトニトリル = 30:70, 流速 0.7 mL/分, アプライ量 20 μ L で分離を行った。分析時間は 5 分で、MS/MS システム API2000 (ABI)に連動させ、イオン化法 APCI, 測定モード MSM ポジティブイオンで解析を行った。インターナルスタンダードに Paroxetine-D₆(ターゲットイオン:336.1 (m/e), プロダクトイオン:76.2, リテンションタイム:0.26 分)

を用い, Bz (394.9/314.2, 0.36 分), Tz (343.1/239.1, 0.35 分), Zc (389.1/245.2, 0.27 分)の測定を行った.

実験結果および考察

本 DJEG 細胞層モデルにより, ブロチゾラム, トリアゾラム, およびゾピクロンの 3 種の睡眠導入剤の透過性を比較評価したところ, トリアゾラムの透過性はブロチゾラムの 1/2 程度と低く, ゾピクロンはさらにブロチゾラムの 1/10 程度と低透過性であることが示された. また, 3 種共存下でのブロチゾラム, トリアゾラム, およびゾピクロンの透過性をそれぞれ単独で上層に添加した場合の透過性と比較評価したところ, ブロチゾラムとトリアゾラムにおいては, 3 種混合時の透過性が有意に低くなり, ブロチゾラムとトリアゾラム, またはゾピクロンと他の 2 種の薬物間に競合的薬物輸送の可能性が示唆された (Fig . 23). これら 3 種の薬物は脂溶性がほぼ同等であるにも関わらず, その DJEG 細胞層透過性は大きく異なっていた. 本結果は, ゾピクロンの胎児移行性が低レベルであることを示唆するとともに, 分子量, および脂溶性などの物性だけでは, 胎盤透過性を正確に評価できないことを示唆している. ブロチゾラム, トリアゾラム, ゾピクロンは, トランスポーター基質としての報

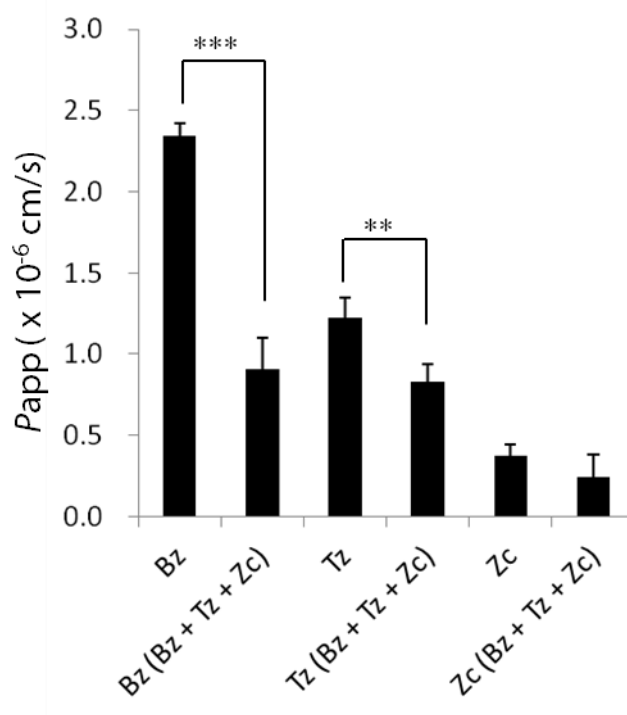


Fig. 23. Apparent permeability coefficient of benzodiazepine drugs (Bz: brotizolam, Tz: triazolam, Zc: zopiclone, each 10 μ M) across the DJEG layers (A to B). Bz (Bz + Tz + Zc) indicates the apparent permeability of Bz added simultaneously each 10 μ M final concentration of Bz, Tz, and Zc to the upper chamber. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$.

告はほとんど無く、トリアゾラムが少なくとも MDR1 の基質では無いことが報告されているのみである¹⁰³⁾。しかしながら、ゾピクロンの透過性が低かったことから efflux トランスポーターの基質の可能性、またはプロチゾラムとトリアゾラムに influx トランスポーターの基質である可能性が考えられた。これらのことから、担体輸送を無視した、生体膜脂質 2 重層モデルだけでは胎盤薬物透過を正確に評価することは困難であり、シンシチオトロホブラストにできる限り類似した細胞層によって、トランスポーターなどの能動輸送をも考慮した *in vitro* 胎盤薬物透過評価モデルを用いることの有用性が示された。また、今後の臨床支援としては、妊娠時にこれらの医薬品が必要な場合、胎盤透過性が低いであろうと予測されるゾピクロンを選択して、胎児移行を無視できる母体有効投与量を予測することなどが考えられる。

また、各薬物の単独透過性と 3 種混合時の各薬物の透過性を比較した結果から、今後の詳細な検討が必要ではあるが、これらの薬物の中から適切な組み合わせを選択し、減量して併用することで薬効を維持しつつ両薬物の胎盤透過を半減させる処方を予測し、設計できる可能性があると考えられる。

本節の結果より、本 DJEG 細胞層モデルを用いて、胎盤薬物透過を包括的に比較評価していくことで、胎児への影響が無い程度に医薬品の胎児移行を抑えられる投与量の設計など、臨床支援としての意義を見いだせる可能性が示された。将来的には、わずかながら存在する、妊娠時に投与された医薬品の F/M 比の知見などとの相関性を検証することで、本モデルの臨床支援としての意義を明確にしていくことができるものと期待する。

第三節 小括

前章までで、DJEG 細胞層がシンシチオトロホブラスト層に極めて類似した細胞特性を有していることが示唆されており、本章では、さらに DJEG 細胞層における実際の経細胞薬物透過機能がシンシチオトロホブラスト様の機能を発揮することを検証した。シンシチオトロホブラストには、BCRP を主とする efflux トランスポーターが備わっており、実に緻密に異物排出機能を担っている。Efflux トランスポーターは、さまざまな基質特異性を有しており、efflux トランスポーターの基質となる薬物の胎児移行はそれらの異物排出機能によって制限されている。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 細胞層モデルの透過性を評価したところ、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 透過には担体輸送の介在を示す濃度依存的な飽和性が認められた。今回はミリセル[®]によって DJEG 細胞層を作製したが、同様の培養メンブレンを備えるトランスウェル[®]で作製した Caco-2 細胞層においては、apical 側への BCRP 発現の局在性が示されている¹⁰⁸⁾。この報告は、培養メンブレン上での細胞層作製においても、トランスポーター蛋白の局在性を再現できる有力な裏付けとなる。本章におけるミリセル[®]上で作製した DJEG 細

胞層モデルによるシメチジン透過性評価の結果も、DJEG 細胞層で発現レベルの高い BCRP が apical 側に局在し、かつその機能を備えていることを強く示唆した。

また、MRPs の基質薬物フルオレセインと MRPs 阻害剤プロベネシドを用いて DJEG 細胞層の透過性を評価したところ、フルオレセインの透過は DJEG 細胞層をプロベネシドで前処置することによって有意に促進された。本結果より、DJEG 細胞層に発現が認められている MRPs は、そのサブタイプが明らかではないが MRPs の排出機能を有しており、本 DJEG 細胞層モデルが MRPs を介した薬物透過も評価できることが判明した。さらに、influx トランスポーターにおいても、MCT の基質薬物であるバルプロ酸の本 DJEG 細胞層モデルの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た。また有効血中濃度域 (500 μ M 付近) では、バルプロ酸の A to B 透過性が、B to A 透過性よりも高く、*in vivo* において報告されているバルプロ酸の高い胎児移行性を予測できたものと考えられる。したがって、本 DJEG 細胞層モデルはシンシチオトロホブラストの主なトランスポーターを介した経細胞輸送を反映できることが妥当性をもって示された。ここまでの検討によって、本 DJEG 細胞層モデルは他に報告例の無い最もシンシチオトロホブラスト層に類似したモデルであり、かつシンシチオトロホブラストに発現している代表的なトランスポーターの機能特性を反映するモデルであることが判明した。

さらに、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 種の睡眠導入剤の透過性比較を行った結果、ゾピクロンの透過が有意に低く、3 種の中ではゾピクロンの胎児移行性が比較的少ないと予測された。また、胎盤関門薬物透過が薬物の物性だけに因らない可能性が示され、妊娠時の薬物療法を支援するための胎児移行性情報を得るために、*in vitro* 胎盤薬物透過モデルによって精度良く医薬品の胎児移行性を予測することの意義が見いだせた。さらに、3 種の睡眠導入剤の共存下で各薬物の本 DJEG 細胞層モデル透過性を評価したところ、これらの睡眠導入剤に担体輸送の競合性があることが示唆され、併用することによって胎児移行性に影響が生じる可能性があることが認められた。

これらの結果から、本 DJEG 細胞層モデルによって薬物の胎児移行性を評価することで、臨床支援として有効活用できる可能性を見いだすことができた。医薬品の正確なヒト胎児移行性情報を得ることができれば、まず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。例えば、糖尿病合併妊娠において食事療法のみで血糖コントロールが不良の場合には、胎盤を通過しないインスリンが使用される。また近年では、経口血糖降下薬グリベンクラミドの胎盤透過性が非常に低いことが報告されており、海外では糖尿病合併妊娠に対する使用が受け入れられつつある¹⁰⁹⁻¹¹¹⁾。妊娠時の薬物療法において問題となるのは、言うまでもなく薬物の胎児移行そのものではなく、移行することによる薬物の直接的なまたは間接的な胎児への有害性の有無である。しかしながら、糖尿病合併妊娠に対するインスリン使用の例のように薬物そのものによる胎児への有害性が明かな場合でも、薬物の胎盤透過性評

価から胎児移行をともしないことが判明することによって、母児の健康に有益となる薬物が今後数多く認められる可能性がある。また、母体への薬物投与によって胎児治療を行うことが有効である例として、胎児頻脈性不整脈に対するジゴキシンの臨床試験例がある。胎児頻脈性不整脈は年間 60 例ほどの発症が推計されており(厚生労働省研究班調べ)、母体への薬物投与による治療例で約 90%の改善効果が認められている。本治療に用いられた医薬品は、ジゴキシンのソタロール、フレカイニドの組み合わせであり、ベラパミルは胎盤透過性が低いために用いられていない。経胎盤的胎児治療には特に薬物の包括的な胎児移行性評価情報が重要であり、薬物のヒト胎盤透過性情報が適切な母体への投与計画を設定するための有用な因子となることは明白である。

今後、医薬品の胎児毒性、催奇形性、経胎盤的胎児治療の有用性など医薬品の胎児安全性情報におけるバイオインフォマティクス的一端に、本 DJEG 細胞層モデルを用いた薬物の胎児移行性評価を組み込むことによって、創薬と臨床応用に対してさらに利用価値の高い情報となることが期待でき、本研究の妊娠時薬物療法の胎児安全性情報蓄積支援という最大の目的に大きく近づけるものと考えられる。

しかしながら、今後検討していくべきいくつかの課題は残っている。まず、MRPs に関しては、DJEG 細胞層におけるサブタイプ毎の透過特性が未知のままである。また、MCT 以外の influx トランスポーター群についても機能評価を行う必要がある。さらに本モデルにおける評価値をより有用なものとするために、各種のトランスポーターの基質薬物、およびその阻害剤によって DJEG 細胞層の担体輸送機能の解析を行い、DJEG 細胞層の薬物透過特性がより *in vivo* を反映すること、および DJEG 細胞層による評価値とわずかながら存在する臨床データとの相関性を検討していく必要がある。

総括

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。そのために、医薬品のヒト胎児移行性評価に適う *in vitro* 胎盤薬物透過評価モデルの構築を試みた。

In vitro 胎盤薬物透過評価モデルの作製のためには、胎盤関門の主要層であるシンシチオトロホブラスト層に類似した細胞機能を有するモデル作製を行っていくことが妥当であると考えられ、さらにこの層は細胞間隙透過の寄与が少ないことで経細胞輸送経路を評価できる必要がある。胎盤関門薬物透過評価モデルの作製において、これまで報告されていたモデルでは細胞間隙透過の寄与が大きく、経細胞輸送を正確に評価できなかった。本研究では、まずより細胞間隙透過を抑えることによって胎盤関門モデルに使用しうる細胞株およびその培養条件の検討を行った。ヒト絨毛由来 BeWo 細胞株と JEG-3 細胞株を用いて、まずは両細胞株の TEER 値を比較検討したところ、JEG-3 細胞層は、BeWo 細胞層に比べて有意に細胞間隙透過を抑えることができると判明した。さらに、JEG-3 細胞の分化を促すための培養条件を検討するために、シンシチオトロホブラスト様の分化を促すいくつかの因子の報告に基づいて、各種の培養条件の下で JEG-3 細胞層を形成した。この結果、CSC[®]培地で培養した JEG-3 細胞層(DJEG 細胞層)モデルが、より強く細胞間隙透過経路を抑えることができると判明し、*in vitro* 胎盤薬物透過評価モデル作製の第一段階として、経細胞輸送の評価ができる可能性のある細胞層を得ることに成功した。

さらに、*in vitro* 細胞モデルにおいては、生体内の細胞特性をできる限り反映していることが必要である。しかしながら、生体内の環境を *in vitro* 細胞モデルで再現することは不可能に近い。そこで、本 DJEG 細胞層モデルにおける胎盤関門との類似性を、シンシチオトロホブラスト様の分化指標を評価することで検証した。まず、AJ 関連蛋白は細胞間の融合と密接に関わっており、サイトトロホブラストはシンシチオトロホブラストへの分化の過程で、ECAD の発現抑制と CAD-11 の発現誘導を伴って細胞融合能を獲得することが報告されている。DJEG 細胞においても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 の発現誘導を認めたことにより、シンシチオトロホブラスト様の細胞融合能を獲得している可能性が示された。本結果は、JEG-3 細胞において、シンシチオトロホブラスト様細胞融合能獲得の可能性を示唆した初めての知見である。また、シンシチオトロホブラストの分化において発現誘導が確認されている TJ 関連蛋白 CLDN1 の発現誘導が DJEG 細胞においても認められ、TJ 形成においてもシンシチオトロホブラスト様の特性をもつ可能性が示された。

さらに、シンシチオトロホブラスト様の特性をよりいっそう検証するため、胎盤における異物排出

機構によって、胎児を保護する役割を一部担っている *efflux* トランスポーターの mRNA 発現プロファイルを確認した。その結果、BCRP の高レベルの発現誘導、および MDR1, MRP5 mRNA 発現プロファイルのシンシチオトロホブラスト類似性が確認され、本 DJEG 細胞層モデルが、*efflux* トランスポーターを介した担体輸送を含めた、胎盤関門の経細胞輸送を評価できる可能性があることが明らかとなった。また、BCRP の mRNA 発現誘導、MDR1 の mRNA 発現抑制に加えて、さらにシンシチオトロホブラスト分化指標である hCG の分泌促進、hPL, NECC1 の mRNA 発現レベルを検討したところ、全ての指標において本 DJEG 細胞層モデルがシンシチオトロホブラスト様の特性を示した。本結果より、NJEG 細胞から DJEG 細胞に分化するにあたって、シンシチオトロホブラスト化の過程をたどっていることが強く示唆された。このようなシンシチオトロホブラスト類似性を維持したまま、経細胞輸送を評価出来る可能性を持った *in vitro* 胎盤関門薬物透過評価モデルは、これまでに全く報告例が無く、本 DJEG 細胞層モデルは現段階では最も胎盤関門薬物透過評価モデルに妥当であると考えられた。

本 DJEG 細胞層モデルはシンシチオトロホブラスト層に類似した細胞間隙輸送経路と細胞特性を有していることが示されたが、実際に胎盤薬物透過性を反映できることを検証するためには、DJEG 細胞層において発現しているトランスポーターが機能していることを検証する必要がある。いくつかのトランスポーター基質モデル薬物において、本 DJEG 細胞層モデルにおける透過性が胎盤関門薬物透過性を反映していれば胎児移行性を本モデルにより評価できることを示すことができる。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 細胞層モデルの透過性を評価したところ、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 透過には担体輸送の介在を示す濃度依存的な飽和性が認められ、BCRP による胎盤透過性を反映することを示唆した。また、MRPs の基質薬物フルオレセインと MRPs 阻害剤プロベネシドを用いて DJEG 細胞層の透過性を評価したところ、フルオレセインの透過は DJEG 細胞層をプロベネシドで前処置することによって有意に促進された。これらの結果は、胎盤で機能している *efflux* トランスポーターが DJEG 細胞層でも機能していることを示唆した。さらに、*influx* トランスポーターにおいても MCT の基質薬物であるバルプロ酸の本 DJEG 細胞層モデルの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た。したがって、全てとは言えないが本 DJEG 細胞層モデルにおいて、シンシチオトロホブラストの主なトランスポーターを介した経細胞輸送を反映できることを示すことができた。これら一連の結果により、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、現段階で最もシンシチオトロホブラストに類似した *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。

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 種の睡眠導入剤の透過性を比較評価した結果、物性だけでは説明できない有意差があることが認められた。これにより、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。また、3種の睡眠導入剤には担体輸送の競合性があることが示唆され、胎児移行性に影響を及ぼす可能性がある併用薬を本モデルによって探り出せる可能性があることが認められた。これらの結果から、本 DJEG 細胞層モデルを用いて医薬品の胎盤透過性を比較評価することで、妊娠時薬物療法において胎児移行を制限できる医薬品の選択や併用薬を含めた処方設計など、臨床支援として有効活用できる情報を得られる可能性を見いだせた。

今後、さらにトランスポーター基質薬物を用いてその機能特性を十分に反映しうることを検証すること、およびわずかながら知られている F/M 値などの臨床知見を基に本 DJEG 細胞層モデルとの *in vivo* 相関性を解析していくことは、本モデルの予測を裏付けるために極めて重要な課題である。これらの課題を解決していくことによって、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、妊娠時の薬物療法における臨床応用のみならず医薬品開発における生殖発生毒性試験、胎盤物質透過に関する基礎的研究などにおいても、標準的な評価モデルとなり得るものと期待できる。その結果、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は間違いない。

結論

今回、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 の発現誘導をともなう、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 基質バ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。

謝辞

本稿を終えるにあたり、終始御懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました恩師、大阪大学大学院薬学研究科教授、中川晋作先生に心より厚く御礼申し上げます。

また、終始御懇切なる叱咤激励を賜りました大阪大学名誉教授、眞弓忠範先生、大阪大谷大学薬学部長、田中慶一先生に心より厚く御礼申し上げます。

さらに本研究の遂行および発表にあたり、終始暖かい御指導と御助言を頂きました大阪大谷大学薬学部教授、廣谷芳彦先生、帝京大学薬学部教授、宇都口直樹先生に深謝致します。

また本稿をまとめるにあたり、全体構想をはじめとした種々の貴重な御指導、御助言を賜りました大阪大学大学院薬学研究科准教授、岡田直貴先生に深く感謝の意を表します。

また本稿のまとめに際し、貴重な御指導、御校閲を賜りました大阪大学大学院薬学研究科教授、橋本均先生、藤尾慈先生、堤康央先生に厚く御礼申し上げます。

さらに本研究の遂行は、次の多くの方々の御協力のもとになしえたものであります。まず、組織切片の作製および免疫染色法に関して御指導を賜りました大阪大谷大学薬学部講師、竹橋正則先生、同助教、筒居秀伸先生に感謝致します。また、貴重な御助言を賜りました大阪大谷大学薬学部教授、藤井敏彦先生、雪村時人先生、同准教授、関庚善先生、楠本豊先生、各方面から御協力を頂きました同臨床薬剤学講座諸氏をはじめとする同教職員諸氏、および大阪大学大学院薬学研究科薬剤学分野諸氏に感謝致します。

最後に、薬剤師業務と育児を両立するとともに、本研究の遂行と本稿の作成を支えてくれた我が妻、真樹子と子供達、雅弥と美弥に心より感謝致します。

参考文献

- 1) 山内あい子, 坂本久美子, 中田栄子, 佐々木幹夫, 谷真琴, 中馬寛 (2007) 情報管理 50, 135-143.
- 2) 林昌洋, 佐藤孝道, 北川浩明 (2011) じほう, 実践妊娠と薬第2版, 1-1009.
- 3) Evseenko, D.A., Paxton, J.W., Keelan, J.A. (2007) Drug Metab. Dispos. 35, 595-601.
- 4) Evseenko, D.A., Paxton, J.W., Keelan, J.A. (2006) Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 290, R1357-R1365.
- 5) Vargas, A., Moreau, J., Le Bellego, F., Lafond, J., Barbeau, B. (2008) Placenta 29, 170-174.
- 6) Kitano, T., Iizasa, H., Terasaki, T., Asashima, T., Matsunaga, N., Utoguchi, N., Watanabe, Y., Obinata, M., Ueda, M., Nakashima, E. (2002) J. Cell. Physiol. 193, 208-218.
- 7) Dejana, E., Orsenigo, F., Molendini, C., Baluk, P., McDonald, D.M. (2009) Cell Tissue Res. 335, 17-25.
- 8) Hemmings, D.G., Lowen, B., Sherburne, R., Sawicki, G., Guilbert, L.J. (2001) Placenta 22, 70-79.
- 9) Inokuchi, H., Takei, T., Aikawa, K., Shimizu, M. (2009) Biosci. Biotechnol. Biochem. 73, 328-334.
- 10) Zhou, Y., Yokel, R.A. (2005) Toxicol. Sci. 87, 15-26.
- 11) Hashida, R., Anamizu, C., Yagyu-Mizuno, Y., Ohkuma, S., Takano, T. (1986) Cell Struct. Funct. 11, 343-349.
- 12) Terasaki, T., Ohtsuki, S., Hori, S., Takanaga, H., Nakashima, E., Hosoya, K. (2003) Drug Discov. Today 8, 944-954.
- 13) Zhang, Y., Li, C.S., Ye, Y., Johnson, K., Poe, J., Johnson, S., Bobrowski, W., Garrido, R., Madhu, C. (2006) Drug Metab. Dispos. 34, 1935-1943.
- 14) Artursson, P., Karlsson, J. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 175, 880-885.
- 15) Mitchell, A.M., Yap, A.S., Payne, E.J., Manley, S.W., Mortimer, R.H. (1995) Placenta 16, 31-39.
- 16) Jin, H., Audus, K.L. (2005) Placenta 26 Suppl A, S96-S103.
- 17) Bode, C.J., Jin, H., Rytting, E., Silverstein, P.S., Young, A.M., Audus, K.L. (2006) Methods Mol. Med. 122, 225-239.
- 18) Asano, N., Kondoh, M., Ebihara, C., Fujii, M., Nakanishi, T., Utoguchi, N., Enomoto, S., Tanaka, K., Watanabe, Y. (2006) Reprod. Toxicol. 21, 285-291.
- 19) Ushigome, F., Takanaga, H., Matsuo, H., Yanai, S., Tsukimori, K., Nakano, H., Uchiumi, T., Nakamura, T., Kuwano, M., Ohtani, H., Sawada, Y. (2000) Eur. J. Pharmacol. 408, 1-10.
- 20) Ushigome, F., Takanaga, H., Matsuo, H., Tsukimori, K., Nakano, H., Ohtani, H., Sawada, Y. (2001) Eur. J. Pharmacol. 417, 169-176.
- 21) Utoguchi, N., Audus, K.L. (2000) Int. J. Pharm. 195, 115-124.

- 22) Utoguchi, N., Magnusson, M., Audus, K.L. (1999) *J. Pharm. Sci.* 88, 1288-1292.
- 23) Liu, F., Soares, M.J., Audus, K.L. (1997) *Am. J. Physiol.* 273, C1596-C1604.
- 24) Iida, K., Kobayashi, M., Kobayashi, K., Saga, S., Hoshino, T., Matsuyama, M. (1994) *J. Electron Microsc.* (Tokyo) 43, 367-372.
- 25) Chong, S., Dando, S.A., Morrison, R.A. (1997) *Pharm. Res.* 14, 1835-1837.
- 26) Israel, P., Masterson, E., Goldman, A.I., Wiggert, B., Chader, G.J. (1980) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 19, 720-727.
- 27) McKhann, G.M., D'Ambrosio, R., Janigro, D. (1997) *J. Neurosci.* 17, 6850-6863.
- 28) Siddharthan, V., Kim, Y.V., Liu, S., Kim, K.S. (2007) *Brain Res.* 1147, 39-50.
- 29) Hirotani, Y., Ikeda, K., Kato, R., Myotoku, M., Umeda, T., Ijiri, Y., Tanaka, K. (2008) *Yakugaku Zasshi.* 128, 1363-1368.
- 30) Kowapradit, J., Opanasopit, P., Ngawhirunpat, T., Apirakaramwong, A., Rojanarata, T., Ruktanonchai, U., Sajomsang, W. (2010) *AAPS PharmSciTech* 11, 497-508.
- 31) Artursson, P., Palm, K., Luthman, K. (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 46, 27-43.
- 32) Sun, H., Zhang, L., Chow, E.C., Lin, G., Zuo, Z., Pang, K.S. (2008) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 326, 117-126.
- 33) Khan, S.I., Abourashed, E.A., Khan, I.A., Walker, L.A. (2004) *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 52, 394-397.
- 34) Meyer zu Schwabedissen, H.E., Grube, M., Dreisbach, A., Jedlitschky, G., Meissner, K., Linnemann, K., Fusch, C., Ritter, C.A., Volker, U., Kroemer, H.K. (2006) *Drug Metab. Dispos.* 34, 524-533.
- 35) Pfarrer, C., Weise, S., Berisha, B., Schams, D., Leiser, R., Hoffmann, B., Schuler, G. (2006) *Placenta* 27, 758-770.
- 36) Guibourdenche, J., Tarrade, A., Laurendeau, I., Rochette-Egly, C., Chambon, P., Vidaud, M., Evain-Brion, D. (2000) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 2550-2555.
- 37) Haimovici, F., Anderson, D.J. (1993) *Biol. Reprod.* 49, 124-130.
- 38) Prouillac, C., Videmann, B., Mazallon, M., Lecoecur, S. (2009) *Toxicology* 263, 100-107.
- 39) Ogura, K., Sakata, M., Okamoto, Y., Yasui, Y., Tadokoro, C., Yoshimoto, Y., Yamaguchi, M., Kurachi, H., Maeda, T., Murata, Y. (2000) *J. Endocrinol.* 164, 171-178.
- 40) Khan, S., Katabuchi, H., Araki, M., Nishimura, R., Okamura, H. (2000) *Biol. Reprod.* 62, 1075-1083.
- 41) Kudo, Y., Boyd, C.A., Millo, J., Sargent, I.L., Redman, C.W. (2003) *J. Physiol.* 550, 3-9.
- 42) Al-Nasiry, S., Vercruysse, L., Hanssens, M., Luyten, C., Pijnenborg, R. (2009) *Placenta* 30, 719-725.
- 43) Harada, M., Kondoh, M., Masuyama, A., Fujii, M., Nakanishi, T., Utoguchi, N., Yagi, K., Watanabe, Y. (2007) *Pharmazie* 62, 291-294.
- 44) Al-Nasiry, S., Spitz, B., Hanssens, M., Luyten, C., Pijnenborg, R. (2006) *Hum. Reprod.* 21, 193-201.

- 45) Kudo, Y., Boyd, C.A., Kimura, H., Cook, P.R., Redman, C.W., Sargent, I.L. (2003) *Biochim. Biophys. Acta* 1640, 25-31.
- 46) von Dadelszen, P., Hurst, G., Redman, C.W. (1999) *Hum. Reprod.* 14, 919-924.
- 47) 林昌洋 (2006) *日本産科婦人科学会雑誌* 58, N77-N78.
- 48) Keelan, J.A., Khan, S., Yosaatmadja, F., Mitchell, M.D. (2009) *J. Immunol.* 183, 5270-5278.
- 49) Pidoux, G., Gerbaud, P., Gnidehou, S., Grynberg, M., Geneau, G., Guibourdenche, J., Carette, D., Cronier, L., Evain-Brion, D., Malassin A., Frendo, J.L. (2010) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 298, C1517-C1526.
- 50) Satterfield, M.C., Dunlap, K.A., Hayashi, K., Burghardt, R.C., Spencer, T.E., Bazer, F.W. (2007) *Endocrinology* 148, 3922-3931.
- 51) Wang, Y., Lewis, D.F., Gu, Y., Zhang, Y., Alexander, J.S., Granger, D.N. (2004) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 2421-2428.
- 52) Getsios, S., MacCalman, C.D. (2003) *Dev. Biol.* 257, 41-54.
- 53) Bussemakers, M.J., Van Bokhoven, A., Tomita, K., Jansen, C.F., Schalken, J.A. (2000) *Int. J. Cancer* 85, 446-450.
- 54) Monahan, T.S., Andersen, N.D., Panossian, H., Kalish, J.A., Daniel, S., Shrikhande, G.V., Ferran, C., Logerfo, F.W. (2007) *J. Vasc. Surg.* 45, 581-589.
- 55) Malassine, A., Frendo, J.L., Blaise, S., Handschuh, K., Gerbaud, P., Tsatsaris, V., Heidmann, T., Evain-Brion, D. (2008) *Retrovirology* 5, 6.
- 56) Rahnama, F., Shafiei, F., Gluckman, P.D., Mitchell, M.D., Lobie, P.E. (2006) *Endocrinology* 147, 5275-5283.
- 57) Yoshie, M., Kashima, H., Bessho, T., Takeichi, M., Isaka, K., Tamura, K. (2008) *Hum. Reprod.* 23, 2766-2774.
- 58) Lee, V.H., Zhang, S.J., Chang, S.M., Fields, M.J., Fields, P.A. (1995) *Biol. Reprod.* 52, 868-877.
- 59) Daoud, G., Rassart, E., Masse, A., Lafond, J. (2006) *J. Physiol.* 571, 537-553.
- 60) Peters, T.J., Chapman, B.M., Wolfe, M.W., Soares, M.J. (2000) *J. Endocrinol.* 165, 443-456.
- 61) Richardson, B.D., Langland, R.A., Bachurski, C.J., Richards, R.G., Kessler, C.A., Cheng, Y.H., Handwerger, S. (2000) *Mol. Cell. Endocrinol.* 160, 183-192.
- 62) Guibourdenche, J., Alsat, E., Soncin, F., Rochette-Egly, C., Evain-Brion, D. (1998) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 1384-1387.
- 63) Asanoma, K., Kato, H., Yamaguchi, S., Shin, C.H., Liu, Z.P., Kato, K., Inoue, T., Miyanari, Y., Yoshikawa, K., Sonoda, K., Fukushima, K., Wake, N. (2007) *J. Biol. Chem.* 282, 24065-24074.
- 64) Asanoma, K., Matsuda, T., Kondo, H., Kato, K., Kishino, T., Niikawa, N., Wake, N., Kato, H. (2003) *Genomics* 81, 15-25.
- 65) Kitano, T., Iizasa, H., Hwang, I.W., Hirose, Y., Morita, T., Maeda, T., Nakashima, E. (2004) *Biol. Pharm. Bull.* 27, 753-759.

- 66) Utoguchi, N., Chandorkar, G.A., Avery, M., Audus, K.L. (2000) *Reprod. Toxicol.* 14, 217-224.
- 67) Ushigome, F., Koyabu, N., Satoh, S., Tsukimori, K., Nakano, H., Nakamura, T., Uchiumi, T., Kuwano, M., Ohtani, H., Sawada, Y. (2003) *Pharm. Res.* 20, 38-44.
- 68) Klaassen, C.D., Aleksunes, L.M. (2010) *Pharmacol. Rev.* 62, 1-96.
- 69) Meyer Zu Schwabedissen, H.E., Grube, M., Heydrich, B., Linnemann, K., Fusch, C., Kroemer, H.K., Jedlitschky, G. (2005) *Am. J. Pathol.* 166, 39-48.
- 70) Deeley, R.G., Westlake, C., Cole, S.P. (2006) *Physiol. Rev.* 86, 849-899.
- 71) Serrano, M.A., Macias, R.I., Briz, O., Monte, M.J., Blazquez, A.G., Williamson, C., Kubitz, R., Marin, J.J. (2007) *Placenta* 28, 107-117.
- 72) Kusuhara, H., Sugiyama, Y. (2005) *Neurorx* 2, 73-85.
- 73) Yeboah, D., Kalabis, G.M., Sun, M., Ou, R.C., Matthews, S.G., Gibb, W. (2008) *Reprod. Fertil. Dev.* 20, 328-334.
- 74) Doyle, L.A., Yang, W., Abruzzo, L.V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A.K., Ross, D.D. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 15665-15670.
- 75) Maliepaard, M., Scheffer, G.L., Faneyte, I.F., van Gastelen, M.A., Pijnenborg, A.C., Schinkel, A.H., van De Vijver, M.J., Scheper, R.J., Schellens, J.H. (2001) *Cancer Res.* 61, 3458-3464.
- 76) St-Pierre, M.V., Serrano, M.A., Macias, R.I., Dubs, U., Hoechli, M., Lauper, U., Meier, P.J., Marin, J.J. (2000) *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 279, R1495-R1503.
- 77) Nagashige, M., Ushigome, F., Koyabu, N., Hirata, K., Kawabuchi, M., Hirakawa, T., Satoh, S., Tsukimori, K., Nakano, H., Uchiumi, T., Kuwano, M., Ohtani, H., Sawada, Y. (2003) *Placenta* 24, 951-958.
- 78) Marzioni, D., Banita, M., Felici, A., Paradinas, F.J., Newlands, E., De Nictolis, M., Muhlhauser, J., Castellucci, M. (2001) *Mol. Hum. Reprod.* 7, 279-285.
- 79) de Virgiliis, G., Sideri, M., Fumagalli, G., Remotti, G. (1982) *Gynecol. Obstet. Invest.* 14, 263-272.
- 80) Ceckova, M., Libra, A., Pavek, P., Nachtigal, P., Brabec, M., Fuchs, R., Staud, F. (2006) *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 33, 58-65.
- 81) Aplin, J.D., Jones, C.J., Harris, L.K. (2009) *Placenta* 30, 293-298.
- 82) Heaton, S.J., Eady, J.J., Parker, M.L., Gotts, K.L., Dainty, J.R., Fairweather-Tait, S.J., McArdle, H.J., Srai, K.S., Elliott, R.M. (2008) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 295, C1445-C1453.
- 83) Coutifaris, C., Kao, L.C., Sehdev, H.M., Chin, U., Babalola, G.O., Blaschuk, O.W., Strauss, J.F. (1991) *Development* 113, 767-777.
- 84) Hori, S., Ohtsuki, S., Tachikawa, M., Kimura, N., Kondo, T., Watanabe, M., Nakashima, E., Terasaki, T. (2004) *J. Neurochem.* 90, 526-536.
- 85) Staud, F., Vackova, Z., Pospechova, K., Pavek, P., Ceckova, M., Libra, A., Cygalova, L., Nachtigal, P., Fendrich, Z. (2006) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 319, 53-62.
- 86) Pavek, P., Merino, G., Wagenaar, E., Bolscher, E., Novotna, M., Jonker, J.W., Schinkel, A.H.

- (2005) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 312, 144-152.
- 87) Schenker, S., Dicke, J., Johnson, R.F., Mor, L.L., Henderson, G.I. (1987) *J. Clin. Invest.* 80, 1428-1434.
 - 88) Hawkins, B.T., Ocheltree, S.M., Norwood, K.M., Eggleton, R.D. (2007) *Neurosci. Lett.* 411, 1-5.
 - 89) Hamilton, R.D., Foss, A.J., Leach, L. (2007) *J. Anat.* 211, 707-716.
 - 90) Sun, H., Miller, D.W., Elmquist, W.F. (2001) *Pharm. Res.* 18, 1542-1549.
 - 91) Briggs, G.G., Roger, K., Freeman, M.D., Sumner, J., Yaffe, D. (2011) Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia., *Drugs in Pregnancy and Lactation*.
 - 92) Froescher, W., Gugler, R., Niesen, M., Hoffmann, F. (1984) *Epilepsia* 25, 244-249.
 - 93) Settle, P., Mynett, K., Speake, P., Champion, E., Doughty, I.M., Sibley, C.P., D'Souza, S.W., Glazier, J. (2004) *Placenta* 25, 496-504.
 - 94) Kumar, S., Wong, H., Yeung, S.A., Riggs, K.W., Abbott, F.S., Rurak, D.W. (2000) *Drug Metab. Dispos.* 28, 857-864.
 - 95) Deguchi, Y., Nozawa, K., Yamada, S., Yokoyama, Y., Kimura, R. (1997) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 280, 551-560.
 - 96) Nakamura, H., Ushigome, F., Koyabu, N., Satoh, S., Tsukimori, K., Nakano, H., Ohtani, H., Sawada, Y. (2002) *Pharm. Res.* 19, 154-161.
 - 97) Silva, M.F., Ijlst, L., Allers, P., Jakobs, C., Duran, M., de Almeida, I.T., Wanders, R.J. (2004) *Drug Metab. Dispos.* 32, 1304-1310.
 - 98) El-Gindy, A., Sallam, S., Abdel-Salam, R.A. (2008) *J. Sep. Sci.* 31, 677-682.
 - 99) Dowling, T.C., Frye, R.F. (1999) *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 732, 239-243.
 - 100) Johnston, J.R., Moore, J., McCaughey, W., Dundee, J.W., Howard, P.J., Toner, W., McClean, E. (1983) *Anesth. Analg.* 62, 720-726.
 - 101) Huisman, M.T., Chhatta, A.A., van Tellingen, O., Beijnen, J.H., Schinkel, A.H. (2005) *Int. J. Cancer* 116, 824-829.
 - 102) Myllynen, P., Vahakangas, K. (2002) *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 48, 131-138.
 - 103) von Moltke, L.L., Granda, B.W., Grassi, J.M., Perloff, M.D., Vishnuvardhan, D., Greenblatt, D.J. (2004) *Drug Metab. Dispos.* 32, 800-804.
 - 104) Ohyama, K., Wada, M., Ohba, Y., Fujishita, O., Nakashima, K., Kuroda, N. (2004) *Biomed. Chromatogr.* 18, 396-399.
 - 105) de Castro, A., Concheiro, M., Quintela, O., Cruz, A., L • ez-Rivadulla, M. (2008) *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48, 183-193.
 - 106) Lee, X.P., Kumazawa, T., Fujishiro, M., Hasegawa, C., Marumo, A., Shoji, Y., Arinobu, T., Seno, H., Sato, K. (2006) *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41, 64-69.
 - 107) Pan, R.N., Lin, C.C., Huang, P.W., Hsiong, C.H., Pao, L.H. (2008) *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 872, 58-62.
 - 108) Xia, C.Q., Liu, N., Yang, D., Miwa, G., Gan, L.S. (2005) *Drug Metab. Dispos.* 33, 637-643.

- 109) Cygalova, L.H., Hofman, J., Ceckova, M., Staud, F. (2009) J. Pharmacol. Exp. Ther. 331, 1118-1125.
- 110) Reece, E.A., Leguizamón, G., Wiznitzer, A. (2009) Lancet 373, 1789-1797.
- 111) Magon, N., Seshiah, V. (2011) Indian J. Endocrinol. Metab. 15, 284-293.