

学位論文題名

妊娠の進行に伴う胎盤トランスポータの発現変動
およびその調節機構に関する研究

学位論文内容の要旨

【目的】胎盤絨毛を構成している栄養膜細胞(トロフォブラスト細胞)は胎盤の成長過程で分化することが知られており、胎盤の機能は成長する胎児に応じて短期間に著しく変化している。トロフォブラスト細胞は母体から胎児方向への栄養素などの輸送あるいは胎児から母体方向への代謝物の排出を担う種々のトランスポータを発現していることが近年の研究で明らかにされている。トランスポータの胎児-母体間と物質輸送に戴対する寄与も胎盤の成長に伴い変化していると推察されるが、妊娠期を通した胎盤輸送機能の変動およびその調節機構に関する研究は十分ではない。そこで、本研究では妊娠期を通した胎盤トランスポータの発現・機能の変動およびその調節機構の一端を明らかにし、胎盤における薬物胎盤透過および相互作用による副作用を回避するための知見を得ることを目的とした。

【結果および考察】はじめに妊娠日齢の異なるラット胎盤に発現している種々の栄養素トランスポータおよび代表的な排出トランスポータの mRNA 発現量を比較した。その結果、胎盤に発現しているトランスポータの多くは妊娠の進行に伴い mRNA 発現量が増加する傾向を示した。しかしながら、それらとは反して妊娠の進行に伴い発現が減少しているトランスポータの存在も確認された。これらの結果より薬物の胎盤透過性あるいはそれらに認識され得る栄養素の胎盤輸送機能は妊娠の時期によって変動していることが示された。葉酸の母体-胎児方向の輸送に関与する FR α 、RFC ならびに HCP1 の発現は増加していた。一方、胎児-母体方向の輸送への関与が示唆されている BCRP は減少していたことから、本研究では胎盤における葉酸輸送に関与するこれらの輸送担体に着目した。

妊娠ラットに葉酸を投与し、胎児および胎盤への移行量を評価した結果、それらの移行量は妊娠の進行に依存して増加していることが示された。この結果は、葉酸輸送担体の発現変動との関連が示唆されるものであった。そこで、ヒト胎盤由来でありサイトトロフォブラスト細胞のモデルとして汎用されている BeWo 細胞およびシンシティオトロフォブラスト細胞で構成されているヒト満期胎盤より調製した BBMVs を用いて葉酸の輸送機構を解析した。BeWo 細胞における葉酸取り込みは pH 依存性を示し、HCP1 の阻害剤であるヘミンは 2 相性を示す葉酸取り込みの低親和性画分を阻害した。一方、RFC の基質である TPP は全く影響を及ぼさなかった。これらの結果より、BeWo 細胞における葉酸取り込みは主に FR α および HCP1 が関与しており、RFC の寄与は小さいことが示唆された。ヒト満期胎盤 BBMVs への葉酸取り込みは、FR α の機能を停止させる PI-PLC 処理によって減少し、ヘミンまたは TPP を共存することにより、その減少の程度は大き

くなった。したがって、ヒト満期胎盤における葉酸輸送は FR α 、RFC ならびに HCP1 の 3 種類の担体によって行われていることが示された。以上の BeWo 細胞およびヒト胎盤 BBMVs の結果より、トロフォブラスト細胞における葉酸の取り込み機構は細胞の分化に伴って変化していることが示唆された。

妊娠期を通して発現の減少が確認された BCRP はその発現量に性差があると報告されている。また、胎盤は性ホルモン分泌能を有する臓器であることから、BCRP の発現は性ホルモンによって調節を受けている可能性が推察された。そこで、胎盤から分泌される性ホルモンであるエストロゲンおよびプロゲステロンが及ぼす影響を BeWo 細胞を用いて評価したところ、エストロン、エストラジオールおよびエストリオールの 3 種類のエストロゲンはいずれも BCRP mRNA の発現を増加させる傾向を示した。一方、高濃度のプロゲステロンは BCRP mRNA 発現を抑制することが明らかとなった。さらに、BCRP のタンパク質発現量はエストラジオール添加によって濃度依存的に増加し、プロゲステロンは BCRP タンパク質発現量を減少させる傾向を示した。エストラジオールおよびプロゲステロンは BeWo 細胞における BCRP mRNA 量を変動させたことより、これらは BCRP の転写活性に影響を及ぼしていることが示唆された。E ϵ らは BCRP プロモータにエストロゲンレセプタ応答配列 (ERE) が存在していることを報告している。そこで、BeWo 細胞および T47D 細胞を用い、ER α の強制発現が BCRP プロモータ活性に及ぼす影響を検討した。その結果、両細胞における BCRP プロモータの応答は ER α を強制発現させることにより有意に増大した。また、T47D 細胞を用いて BCRP プロモータの上流の削除および ERE 配列への変異導入の影響を確認したところ、ERE (-243/-225) を失うことによってその活性は著しく低下した。したがって、ER α は ERE を介して BCRP プロモータの応答を増強していることが示唆された。しかしながら、BeWo 細胞においてプロゲステロンは BCRP mRNA およびタンパク質発現量を抑制させるにも関わらず、プロモータ活性にはほとんど影響を及ぼさなかった。そこで、次に BeWo 細胞への長時間の性ホルモン接触が BCRP プロモータ活性に及ぼす影響を評価した。その結果、エストラジオールの添加はそのプロモータの応答に対して何ら影響を与えなかったのに対し、プロゲステロンはその応答を抑制する傾向が示された。したがって、プロゲステロンによる BCRP の発現減少は BCRP プロモータを介していることが示された。以上の結果より、性ホルモンによる BCRP の発現調節は、プロモータの転写活性への影響により行われていることが示唆された。

【結論】胎盤トランスポータの発現は妊娠期に応じて変動しており、胎盤の葉酸輸送能は FR α 、RFC、HCP1 ならびに BCRP の発現量に依存して変化することが示唆された。母体から胎児方向への葉酸輸送に寄与する FR α 、RFC ならびに HCP1 の発現は、トロフォブラスト細胞の形態と関連していることが示唆された。BeWo 細胞を用いた検討により、胎児から母体方向への葉酸輸送に寄与する BCRP の発現は、エストラジオールおよびプロゲステロンなどの性ホルモンによって調節を受けていることが示された。さらに、BCRP のプロモータ活性は ER α -ERE を介して増強し、プロゲステロンの長期接触では抑制されることから、胎盤における性ホルモンによる BCRP の発現調節はプロモータの転写活性への影響であることが示唆された。以上の結果より、胎盤の輸送機能は成長する胎児の要求に応じて変化しており、それらを担うトランスポータの発現量の変動は、胎盤における細胞の分化や性ホルモンの分泌などの生理変化と強く関連していることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	井関	健
副査	准教授	菅原	満
副査	准教授	宮内	正二
副査	准教授	武隈	洋
副査	講師	平野	剛

学位論文題名

妊娠の進行に伴う胎盤トランスポータの発現変動 およびその調節機構に関する研究

本学位論文の筆者は胎盤における物質輸送機構、特に妊娠期を通して生じるそれらの変化を明らかにすることを目的として以下の検討を行っている。

(1) 胎盤トランスポータの妊娠期を通じた発現変動

本論文は胎盤における種々の栄養素トランスポータおよび排出トランスポータの妊娠期を通じた発現量の変動を解析している。その結果、トランスポータの種類によって発現量が増加または減少することを見出し、これらのトランスポータが担う胎盤の物質輸送能は妊娠期を通じて変化していることを強く示唆した。特に、筆者は胎児の健全な成長に必須な栄養素である葉酸を輸送するトランスポータの妊娠期を通じた発現量の増大を示しており、胎盤の生理的な役割を考察する上で有用な知見を見出している。また、胎盤における輸送能が妊娠期に依存しているという知見は妊婦への薬物治療を行う上で、その胎児への移行性および栄養素との相互作用を考慮するために重要な情報を与えうると考えられる。

(2) 胎盤における葉酸輸送機構の解析

筆者は妊娠期に発現量の変動が確認された葉酸輸送機構に着目し、ヒト胎盤絨毛癌由来の BeWo 細胞およびヒト満期胎盤より調製された Brush-border membrane vesicles の二つのツールを用いて詳細な解析を行っている。その結果、胎盤における葉酸輸送機構は、絨毛を構成しているトロフォブラスト細胞の形態に依存して輸送に寄与するトランスポータの種類が変化していることを明らかにした。さらに、近年報告された葉酸トランスポータである Heme carrier protein (HCP1) が胎盤の葉酸輸送に

寄与していることを示唆し、この知見は新規性があると判断できる。また、筆者は *in vitro* の検討のみならず、ラットを用いた検討によって胎盤の葉酸輸送を評価しており、これらの機構が胎盤において担う生理的な役割を考察するために十分な知見を得ている。

(3) Breast cancer resistance protein (BCRP) の発現調節機構に関する検討

筆者は胎盤において胎児から母体方向への葉酸輸送に寄与している BCRP の発現量が妊娠中期から満期にかけて著しく減少していることを見出し、その発現調節機構に関して検討を行っている。その結果、BCRP の発現は胎盤の機能の一つである性ホルモン（エストラジオールおよびプロゲステロン）の分泌と関連して調節を受けていることを明らかにした。さらに、筆者はその調節機構に関して BCRP のプロモーター機能の解析を行い、胎盤においてエストラジオールはプロモーター上に存在するエストロゲン応答配列を介して BCRP の発現を増大させることを示した。さらに、一定時間以上に渡ってプロゲステロンが存在することによって BCRP のプロモーターの活性は抑制されることが示されている。したがって、本論文により妊娠期の進行に伴う胎盤の BCRP の発現減少は、胎盤より分泌されるエストラジオールおよびプロゲステロンのバランスによって調節を受けていることが強く示唆された。生体内における BCRP の発現調節機構に関しては更なる検討を要するが、これらの知見は胎盤におけるトランスポータの発現調節において性ホルモンが重要な役割を担うことを示しており、今後の胎盤トランスポータに関する検討に有用な情報を与えうると考えられる。

以上、本論文はこれまでに多く行われてきた胎盤のトランスポータに関する検討とは異なり、時間依存的なトランスポータの発現量の変化およびその調節機構を解明するべく検討を行うことで、胎盤輸送に関して新しい知見を与えている。これらの知見は妊婦への安全な薬物治療を行うための有用な情報となり得ることが期待でき、筆者は博士（薬学）の学位を受けるに十分値するものと認められる。