17S2-05

培養トロフォブラストを用いた胎盤関門における
薬物透過機構の解明

○宇都口直樹¹, 高橋剛視¹, 安河内郁恵¹, 尾崎菜穂子¹,
藤井まき子¹, 中島恵美², 渡辺善照¹

¹昭和薬科大学薬剤学研究室, ²共立薬科大学薬剤学研究室

CHARACTERIZATION OF DRUG TRANSPORT MECHANISM
ACROSS THE PLACENTAL BARRIER USING CULTURED
TROPHOBLAST

¹Naoki Utoguchi, ¹Tsuyoshi Takahashi, ¹Ikue Yasukouchi, ¹Naoko Ozaki, ¹Makiko
Fujii, ²Emi Nakashima, ¹Yoshiteru Watanabe

¹Showa Pharmaceutical University, ²Kyoritsu College of Pharmacy

【目的】胎盤は、母体から胎児への選択的物質透過の障壁として機能しており、これは胎盤関門と呼ばれている。胎盤関門において、胎児の成長に必須であるアミノ酸や糖類は能動的に透過するが、その他の物質は透過が制限されている。しかし、一部の薬物は本関門を透過し、それらの中には胎児に毒性や催奇性等の問題を生じるものもあり、妊婦への薬物療法の安全性は確立されていないものが多い。その原因として、胎盤関門における薬物透過の詳細な機構がほとんど解明されていないことが挙げられる。そこで、胎盤関門の本体であると考えられているトロフォブラスト層における薬物透過機構を明らかにすることを目的に、今回はジペプチド、薬酸およびデヒドロエピアンドロステロン硫酸抱合体 (DHEAS) の透過機構について、ヒト由来の培養トロフォブラスト層を用い検討した。

【方法】細胞：トロフォブラストとしてヒト choriocarcinoma 由来 BeWo 細胞 (clone b30) を用いた¹⁾。

取り込み実験：ジペプチド輸送系の評価に [¹⁴C]glycylsarcosine (Gly-Sar)、薬酸輸送系の評価に [³H]薬酸および [³H]methotrexate (MTX)、DHEAS 輸送系の評価に [³H]DHEAS を用いた。BeWo 細胞を 12-well 上に播種・培養し、コンフルエント時に実験に供した。培地を除去後、放射ラベルした薬物を添加し、一定時間後 buffer を吸引除去後、冷 buffer にて洗浄し、細胞に取り込まれた薬物量を液体シンチレーションカウンタにて測定した。

透過実験：コラーゲンコーティングを施した透過チャンパー (IntercellTM; クラボウ社) の膜上に BeWo 細胞を播種、培養し、実験に供した。薬物を apical 側 (母体側) または basal 側 (胎児側) に添加し、経時的にその透過量を測定した。

【結果・考察】

ジペプチド輸送：BeWo 細胞における [¹⁴C]Gly-Sar の取り込みは、高濃度で飽和が認められた。またエネルギー代謝阻害剤 (アジ化ナトリウム, 2,4-ジニトロフェノール) により取り込みの阻害が観察された。さらに [¹⁴C]Gly-Sar の取り込みはジ、トリペプチドおよびジペプチド構造類似薬物により阻害されが、アミノ酸、テトラペプチドでは阻害を受けなかった (Table 1)。BeWo 細胞層における [¹⁴C]Gly-Sar の apical 側から basal 側への透過は、過剰量の Gly-Sar、セファレキシンにより阻害された。以上の結果から、トロフォブラストにジペプチド特殊輸送系が機能していることが示唆された。

Table 1 Effects of Various Peptides or Peptide-like Drugs on [³H]Gly-Sar Uptake by BeWo Cells ^a

Inhibitor	Relative uptake (% of control) ^b
Gly	96.1 ± 3.9
Gly-Leu	31.9 ± 2.6 ^c
Gly-Pro	40.7 ± 3.2 ^c
Gly-Sar	47.3 ± 4.2 ^c
Gly-Gly-Gly	62.8 ± 4.5 ^c
Gly-Gly-Gly-Gly	101.3 ± 8.3
Cephalexin	18.6 ± 7.1 ^c
Cefadroxil	52.3 ± 11.4 ^c
Captopril	48.8 ± 3.7 ^c

^a [³H]Gly-Sar uptake by BeWo cells was performed in the presence of 10 mM of indicated agents.

^b Each value represents mean ± SD of four replicate experiments.

^c *p* < 0.005 vs untreated control (100%).

葉酸輸送: BeWo細胞における ^3H 葉酸の取り込みは高濃度で飽和が認められた。また4℃条件やエネルギー代謝阻害剤により取り込みの低下が観察された。さらに ^3H 葉酸の取り込みは、過剰量の葉酸、構造類似体であるMTXや5-メチルテトラヒドロ葉酸により阻害された。Lineweaver-Burk plots解析により、葉酸の取り込みをMTXが、MTXの取り込みを葉酸がそれぞれ競合阻害していることが示された (Fig. 1)。BeWo細胞層における ^3H 葉酸のapical側からbasal側への透過は、basal側からapical側への透過に比べ有意に高かった。また ^3H 葉酸のapical側からbasal側への透過は過剰量の葉酸により阻害された。以上の結果から、トロフォプラストに葉酸特殊輸送系が機能していることが示唆された。In vivoにおいて、葉酸の胎児血中濃度は母体血中のそれに比べ有意に高いことが知られているが、本現象に、葉酸特殊輸送系が関与していることが推察された。

DHEAS輸送系: エストロゲンなどのホルモン前駆体であるDHEASは、胎児副腎で作られ、胎盤でエストロゲンに変換される。さらに高濃度のDHEASは胎児毒性を示すことから、胎児側から胎盤への輸送系が存在すると予想される。そこでBeWo細胞におけるDHEAS取り込み機構を検討した。DHEASのbasal側からの取り込みはapical側からのそれに比べ有意に高かった。またbasal側からのDHEASの取り込みは過剰量のDHEASにより阻害された。以上の結果より、DHEASは胎児から胎盤へ特殊輸送系を介して移行していることが示唆された。DHEASは有機アニオントランスポーターの一つであるOAT4の基質となることが報告されており、現在その詳細を検討中である。

以上、胎盤関門には種々の特殊輸送系が機能しており、母体・胎児間の薬物移行・薬物動態を決定付ける重要な因子として働いていることが推察された。

Fig. 1 A: Lineweaver-Burk plots of the uptake of folic acid by BeWo cells. Uptake was measured in the absence (○) or presence of 2 μM methotrexate (●). B: Lineweaver-Burk plots of the uptake of methotrexate by BeWo cells. Uptake was measured in the absence (△) or presence of 2 μM folic acid (▲). The vertical bar through each point represents the SD of four replicate experiments.

[ABSTRACT] Drug transport mechanism across the placenta is still unknown. The trophoblast that form the placental barrier have an important role in controlling the passage of molecules from mother to fetus. In this study, we investigated that dipeptide and folic acid are actively transported by transporters on the trophoblast. The human choriocarcinoma cell line, BeWo, was cultured on tissue culture plates. When the cells reached confluence, drug uptake experiments were performed. The uptake of [^{14}C]glycylsarcosine ([^{14}C]Gly-Sar) by BeWo cells was saturated at higher concentrations. The metabolic inhibitors significantly inhibited the uptake of [^{14}C]Gly-Sar. In addition, various di- or tri-peptides inhibited the uptake of [^{14}C]Gly-Sar. The uptake of [^3H]folic acid was saturable at higher concentrations and inhibited by metabolic inhibitors. Analogs of folic acid, methotrexate and 5-methyltetrahydrofolate, inhibited the uptake of [^3H]folic acid by BeWo cells. Kinetic analysis using Lineweaver-Burk plots revealed that methotrexate competitively inhibited the uptake of [^3H]folic acid and folic acid competitively inhibited the uptake of [^3H]methotrexate. The findings confirm that dipeptide and folic acid are transported by their transporters on BeWo cell monolayers. The dehydroepiandrosteron sulfate (DHEAS) uptake by BeWo cells from basal side of the cells was higher than that from apical side, and the uptake was inhibited by an excess amount of DHEAS. The findings confirm that the carrier of DHEAS exists on the basal membrane of BeWo cells. This work demonstrated the possibility of using a human monolayer-forming cell line, BeWo, to characterize putative trans-trophoblast transport mechanisms and their potential roles in controlling nutrients and drug across the placental barrier. **[Reference]** ¹⁾ Liu F., Soares M. J., and Audus K. L. Permeability properties of monolayers of the human trophoblast cell line BeWo. *Am. J. Physiol.*, 273, C1596-C1604, 1997.