

# 胎盤関門における内分泌攪乱化学物質（環境ホルモン）の透過機構の解明

## Transport mechanism of endocrine disrupters across placental barrier

研究代表者 昭和薬科大学薬剤学研究室 講師 宇都口 直樹

Assistant Professor, Biopharmaceutics and Pharmaceutics, Showa Pharmaceutical University, Naoki UTOGUCHI

The placenta serves as a semipermeable barrier separating the maternal and fetal circulations. The placental barrier is composed of a single layer of trophoblasts that have the important role of controlling the passage of molecules from the mother to the fetus. However, endocrine disrupters permeability characteristics of trophoblast monolayers are not well understood. In this study, I investigate a trophoblastic cell culture model to clarify the mechanism of endocrine disrupter transport across the placental barrier. This work demonstrates the possible usefulness of a human monolayer-forming cell line, BeWo, to characterize putative trans-trophoblast transport mechanisms and their potential roles in controlling endocrine disrupters transport across the placenta barrier.

### 1. 研究目的

近年、内分泌攪乱化学物質（環境ホルモン）の人体への影響が言われ始め、数多くの問題点、危険性が報告され、環境ホルモンへの不安は社会問題にまでなっている。環境ホルモンは人体の種々の部位・場面で問題となるが、中でも胎児期は最も盛んに細胞が増殖する時期であるため、環境ホルモンの影響が最も重篤なものとなる。

さて、母体—胎児間には胎盤が存在し、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いる。しかしながら、一部の化学物質は本関門を透過し、胎児にまで移行するため、毒性や催奇性等の重篤な問題を生じる。この胎盤関門における環境ホルモンや種々の化学物質の透過機構は現在のところほとんど解明されていない。そこで申請者は、胎盤関門における環境ホルモンの透過機構を明らかとし、それら環境ホルモンの胎児移行を防ぐ方法論を見だし、胎児の安全を確立することを最終的な研究の目的としている。

これまでの胎盤関門における物質透過に関する研究は、*in vivo*での検討が主であるため、その詳細な機構はほとんど解明されていない。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を用い、培養トロフォブラスト層を用いた *in vitro*胎盤関門再構築を行い、本系を用いて胎盤関門における物質透過機構の解明を行うこととした。

そこでまず、本評価系が生体における胎盤機能を発現しているか否かを、ビタミンの透過を指標に検討した。1つは葉酸に着目した。葉酸は胎児の成長に必須な物質であり、またそ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から胎盤関門を能動的に透過する機構が存在することが推察される。また、アスコルビン酸はヒトにおいては生合成できないことから、胎児は母体からの供給に頼らざるを得ないこと、またアスコルビン酸の胎児の血中濃度は母体のそれに比べ有意に高いことから、同様に能動的に胎盤関門を透過する機構が存在することが推察される。したがって、これらのビタミンの能動輸送系が *in vitro*胎盤関門再構築系において認められるか否か検討した。

## 2. 研究経過

### 【方法】

**細胞培養**：ヒト由来トロフォブラストとしてBeWo細胞を用い、既報の方法により培養した (Utoguchi, N. *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, **88**, 1288, 1999).

**取り込み実験**：BeWo細胞を12穴プレート上に播種、培養し、コンフルエント時に実験に用いた。培地を吸引除去後、buffer (pH7.4, 37°C) により洗浄し、 $[^3\text{H}]$ 葉酸または $[^{14}\text{C}]$ アスコルビン酸を含む試験液を添加した。一定時間後、試験液を吸引除去し、水冷したbufferにより3回洗浄し、0.1 M NaOH (1% Triton X-100含有) 溶液を加え、細胞を溶解した。この溶液の放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定、細胞内に取り込まれたそれぞれの物質を定量した。

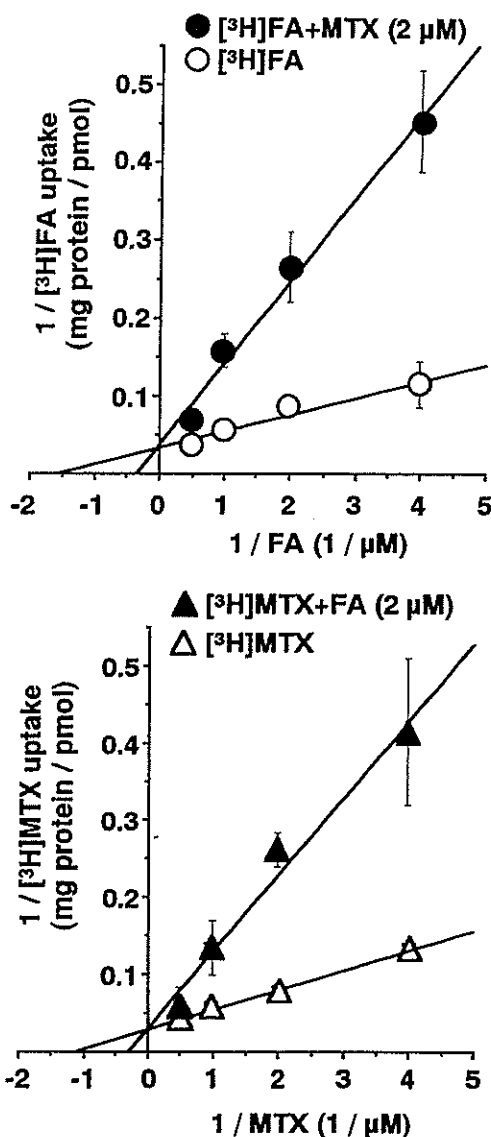
**透過実験**：BeWo細胞をコラーゲンコーティングした多孔膜透過チャンパー (インターセル ; クラボウ社) 上に播種、培養し、9日間培養したものを実験に用いた。培地を吸引除去しapical側に $[^3\text{H}]$ 葉酸を添加した。apical側 (母体側) からbasal (胎児側) に透過した $[^3\text{H}]$ 葉酸量を液体シンチレーションカウンターにて測定した。

### 【結果・考察】

#### 1. 葉酸輸送に関する検討

BeWo細胞における葉酸の取り込みは、高濃度で飽和した。曲線から得られたBeWo細胞における葉酸の $K_m$ 値は $0.5 \mu\text{M}$ であった。また $[^3\text{H}]$ 葉酸の取り込みは過剰量の非標識葉酸および葉酸構造類似化合物 (メソトレキサート ; MTX, 5-メチルテトラヒドロ葉酸 ; 5-MTHF) によって濃度依存的に阻害された。この阻害形式をLineweaver-Burk plotにより解析した結果、MTXは葉酸の取り込みを競合的に阻害し、また葉酸はMTXの取り込みを競合的に阻害することが示された (Fig. 1)。

さて、胎盤関門における物質の輸送は、母体側から胎盤を通過し、胎児側へ移行する透過によるものである。そこで透過実験チャンパーを用いた葉酸特殊輸送系の評価を行った (Fig. 2)。 $[^3\text{H}]$ 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、apical側からbasal側への $[^3\text{H}]$ 葉酸の透過は過剰量の非標識葉酸により阻害された。以上の結果より、葉酸はapical側 (母体) からbasal側 (胎児) へ特殊輸送系を介して透過していることが示唆された。



**Fig. 1** Lineweaver-Burk plots for the uptake of folic acid (FA) and methotrexate (MTX) by BeWo cell monolayers.

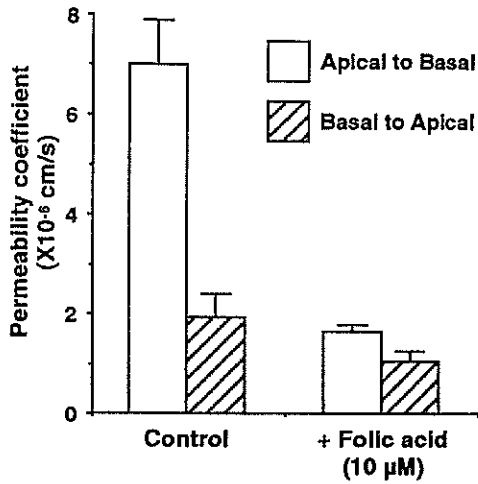


Fig. 2 Permeability coefficients of [<sup>3</sup>H]folic acid (10 nM) across BeWo cell monolayers

## 2. アスコルビン酸輸送に関する検討

BeWo細胞におけるアスコルビン酸の取り込みは、高濃度で飽和が観察された (Fig. 3)。Eadie-Hofstee plotの解析からBeWo細胞におけるアスコルビン酸のK<sub>m</sub>値は28 μMであった。

次にBeWo細胞におけるアスコルビン酸取り込みにおよぼすエネルギー代謝阻害剤の影響を検討した。アスコルビン酸の取り込みは、エネルギー代謝阻害剤である2,4-ジニトロフェノールにより有意に減少した。また、4℃においても同様の結果が得られた。したがって、BeWo細胞によるアスコルビン酸取り込みは、エネルギーを必須とする能動輸送であると推察された。

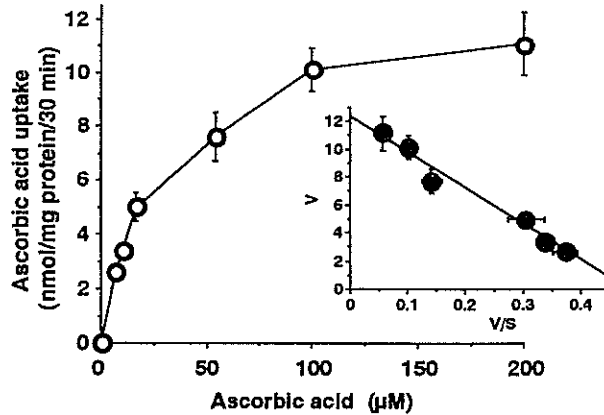


Fig. 3 Concentration-dependent uptake of [<sup>14</sup>C]ascorbic acid by BeWo cells

さらに、アスコルビン酸の取り込みに及ぼす構造類似化合物の影響について検討を行った。[<sup>14</sup>C]アスコルビン酸の取り込みは、過剰量のアスコルビン酸およびアスコルビン酸構造類似化合物であるD-イソアスコルビン酸を添加することにより、濃度依存的に減少した (Fig. 4)。本輸送系はアスコルビン酸のみを特異的に認識するのではなく、他の構造類似化合物も認識する担体であることが示唆された。

### 3. 研究成果

以上、今回の検討によりBeWo細胞層に葉酸、アスコルビン酸のトランスポーターが機能していることを明らかにした。

### 4. 今後の課題と発展

葉酸、アスコルビン酸のトランスポーターは生体内で機能していると考えられるトランスポーターであり、BeWo細胞がそれらin vivoの性質を反映した細胞であることが示唆された。これら基礎検討をふまえて、今後は種々の環境ホルモンの胎盤透過性を本系を用いて評価する予定である。

### 5. 発表論文リスト

1. N. Utoguchi, S. Suzuki, T. Nakanisi, K. Tanaka, K.L. Audus, Y. Watanebe. Carrier-Mediated Transport of Dipeptide in Trophoblast Monolayers as a Model of the Human Trophoblast. (Submitted)
2. T. Takahasi, N. Utoguchi, A. Takara, N. Yamamoto, T. Nakanisi, K. Tanaka, K.L. Audus, Y. Watanebe. Carrier-Mediated Transport of Folic Acid in BeWo Cell Monolayers as a Model of the Human Trophoblast. (Submitted)

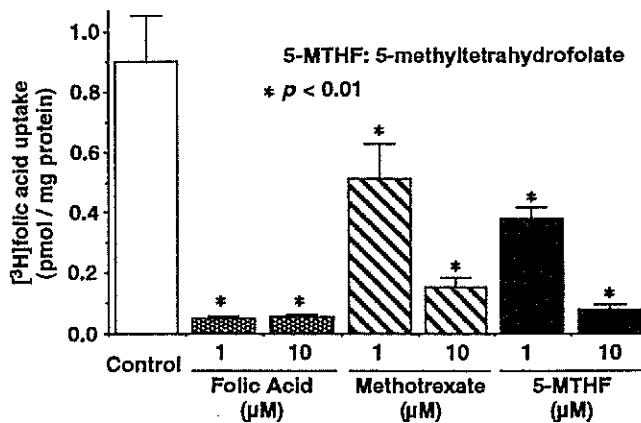


Fig. 4 Effect of folic acid and its structural analogs on the uptake of [<sup>3</sup>H]folic acid (10 nM) by BeWo cell monolayers.