

妊娠期の適切な葉酸摂取に向けた  
胎盤葉酸輸送担体の制御機構に関する研究

北海道大学 大学院薬学研究院 古堅 彩子

(〒060-0812 札幌市北区北 12 条西 6 丁目 電話番号：011-706-3235)

【要旨】

葉酸は胎児の成長に重要な栄養素であり、妊娠期を通して適切な葉酸レベルを維持する必要がある。一方、胎児への葉酸輸送において胎盤は重要な役割を果たす。胎盤における葉酸の輸送には、*folate receptor  $\alpha$*  (FR $\alpha$ ), *reduced folate carrier* (RFC), *proton coupled folate transporter* (PCFT) などの葉酸輸送担体が関与する。したがって、胎盤における葉酸輸送担体の発現・機能制御因子に関する基礎情報は、児の疾病リスク低減および予防において重要と考えられる。本検討では、葉酸輸送担体の発現・機能制御因子として *Histone deacetylases* (HDACs) に着目した。本研究は、胎盤における葉酸輸送制御機構の一端を明らかにすることで、妊娠期の葉酸摂取に関する有用な知見を得ることを目的とした。

ヒト胎盤モデル BeWo 細胞において、FR $\alpha$  および PCFT の発現に HDAC が関与していることが示唆された。また、BeWo 細胞およびヒト満期胎盤において class I の HDACs (HDAC1, 2, 3, 8) の mRNA 発現を確認した。さらに、ヒト満期胎盤において、RFC と PCFT の発現レベルは同程度であり、FR $\alpha$  の発現レベルは RFC および PCFT と比較して高いことが示された。HDACs に関しては、HDAC1-3 の発現レベルは同程度であり、HDAC8 の発現は 1-3 と比較して低いことが示された。また、*in vivo* の検討により、ラット胎盤における rFr $\alpha$  および rPcft の発現は妊娠の進行に伴い増大傾向を示すこと、rHdac2 および rHdac8 の発現は減少傾向を示すことが明らかとなった。また、HDAC 阻害剤である *valproic acid* (VPA) の投与は、妊娠後期のラット胎盤における rFr $\alpha$  および rPcft の発現を減少させることが示唆された。

1、調査研究目的

葉酸は胎児の成長に重要な栄養素であり、妊娠期における葉酸欠乏は児の神経管閉鎖障害リスクと関連する。葉酸サプリメントの摂取は、このリスク低減させることから、本邦においても妊娠前後に 400  $\mu$ g/日の摂取が推奨されている<sup>2)</sup>。さらに、妊娠進行に伴い葉酸の需要は高まること、その他の様々なリスク (胎児発育不全、妊娠高

血圧症) の低下に関連する可能性も報告されていることから<sup>3-6)</sup>、妊娠期を通して適切な葉酸レベルを維持する必要がある。

一方、胎児への葉酸輸送において胎盤は重要な役割を果たす。胎盤における葉酸の輸送には、細胞内への取り込み方向に folate receptor  $\alpha$  (FR $\alpha$ ), reduced folate carrier (RFC), proton coupled folate transporter (PCFT) が、細胞外への排出方向に breast cancer resistance protein (BCRP) および multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) などの葉酸輸送担体が関与することが報告されている<sup>7)</sup>。したがって、胎盤における葉酸輸送担体の発現・機能制御因子に関する基礎情報は、児の疾病リスク低減および予防において重要となる。我々はこれまでに、Histone deacetylases (HDACs) 阻害剤である valproic acid (VPA) が胎盤モデル細胞における葉酸輸送担体の発現・機能を変化させる可能性を示した<sup>8)</sup>。HDACs は種々の遺伝子発現制御において重要な役割を担うものの、胎盤における葉酸輸送担体の発現制御の詳細なメカニズムは明らかとなっていない。

そこで本研究は、胎盤の葉酸輸送担体の発現・機能制御機構における HDACs の関与について評価することで、妊娠期の葉酸摂取に関する有用な知見を得ることを目的とした。

## 2、調査研究方法

### 2-1 試薬

バルプロ酸ナトリウム塩 (VPA Na) およびバルプロ酸 (VPA) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) より、バルプロミド (Valpromide; VPM) は Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX) より購入した。

### 2-2 使用細胞

ヒト胎盤絨毛癌由来である BeWo 細胞を使用した。BeWo 細胞は、非働化した 15% FBS、ペニシリン-ストレプトマイシンを含む F-12K を培養液とし、37 °C、5 % CO<sub>2</sub>-95 % air インキュベーター内で培養した。培養液の交換は 1-2 日おきに行い、継代は、トリプシン処理により細胞を剥離させて行った。BeWo 細胞を 12 穴プレートに播種し培養した後、ISOGEN II (Nippon Gene) を用いて total RNA を抽出した。

### 2-3 使用動物

妊娠 Wistar 雌性ラット (12-13 週齢) を日本クレア株式会社より購入した。なお、プラグ確認日を妊娠 0 日目 (Gestational day 0: G0) とし、G9-13 を妊娠中期、G16-20 を妊娠後期とした。ラットは室温 23 ± 2°C、湿度 60 ± 10%、明暗周期 12 時間毎、自由摂食で飼育した。動物実験プロトコルは北海道大学 動物実験委員会により承認を得た。VPA

Na を蒸留水に溶解し、ろ過滅菌した溶液を使用した。VPA Na 溶液を 1 日 1 回、ゾンデ管を用いて 4 日間連続経口投与した。妊娠中期の検討では G9-G12、後期では G16-19 に投与した (400 mg/kg/day)。コントロールには同量の蒸留水を投与した。最終投与 24 時間後にセボフルランによる麻酔下で断頭し、開腹して胎盤を回収した。摘出した胎盤は氷冷した PBS で洗浄した。組織を細断した後、50-100 mg 程度を ISOGEN II 中でホモジナイズし、total RNA を抽出した。

#### 2-4 ヒト胎盤組織を用いた検討

ヒト胎盤組織を用いた検討は、北海道大学病院 自主臨床研究審査委員会の承認を得て実施した (研究番号: 018-0138)。同意取得時において年齢が 20 歳以上で、帝王切開により分娩する患者を対象とした。研究の参加にあたり十分な説明を実施し、患者本人の自由意思による文書同意を得た。帝王切開による出産後、1 時間以内に搬出し実験に使用した。胎盤を生理食塩水で洗浄後、絨毛部分を回収した。組織 50-100 mg 程度を ISOGEN II 中でホモジナイズし、total RNA を抽出した。

#### 2-5 Real-time PCR および RT-PCR

BeWo 細胞、ラット胎盤、ヒト胎盤から抽出した total RNA を使用した。逆転写には Rever Tra Ace (TOYOBO) を使用した。Real-time PCR は、KAPA SYBR Fast qPCR Kit (KAPA Biosystems) および Table 1 に示した塩基配列の Primer を使用した。反応および検出には Mx3000™ Real-time PCR System (STRATAGENE) もしくは Light Cycler® 480 System II (Roche, Basel, Switzerland) を使用した。

RT-PCR では、HotStarTaq (QIAGEN) および Table 1 に示した塩基配列の Primer を使用した。PCR 産物を 2%アガロースゲルにアプライし、100 V、TAE buffer 中にて電気泳動を行った。泳動したゲルを ethidium bromide で染色し、LAS-1000 UV min (FUJIFILM) にてバンドを観察した。

#### 2-6 統計解析

BeWo 細胞の検討では、2 群間の有意差の検定を Student's t-test により行った。ラット胎盤の遺伝子発現は妊娠期と VPA 投与を要因として、two-way analysis of variance (ANOVA) により解析した。2 要因に交互作用があった場合は Tukey-Kramer test を行った。P < 0.05 を統計的に有意とした。解析は、JMP Pro (SAS Institute, Cary, NC) を用いて行った。

### 3、調査研究成果

### 3-1 VPAによる葉酸輸送担体発現変化におけるHDACの関与 (BeWo細胞)

これまでに、VPAが葉酸輸送担体であるFR $\alpha$ やPCFTの発現・機能を増大させることをヒト胎盤由来BeWo細胞において報告した (Figure 1A)<sup>8)</sup>。そこで、VPAによる葉酸輸送担体発現増大におけるHDACの関与について、VPAの類縁体である valpromide (VPM) を用いて検討を行った。VPMは、HDAC阻害作用もたないVPAの誘導体である<sup>9)</sup>。VPMの曝露は、葉酸輸送担体のmRNA発現量に影響を及ぼさないことが示された (Figure 1B)。これらの結果から、VPAによる葉酸輸送担体 (FR $\alpha$ , PCFT) の発現変化にはHDAC阻害作用が関与している可能性が示唆された。

### 3-2 BeWo細胞およびヒト胎盤組織におけるHDACs発現

続いて、BeWo細胞におけるHDACs発現をRT-PCRにて確認した。HDACはclass I-IVに分類され、VPAはclass IのHDACアイソフォーム (HDAC1, 2, 3, 8) の阻害作用を有することが知られている。BeWo細胞において、class Iの全てのアイソフォームの発現が確認された (Figure 2A)。また、ヒト満期胎盤の絨毛部分におけるHDACsの発現も確認された (Figure 2B)。

さらに、葉酸輸送担体およびHDACs発現レベルについてreal-time PCRにて検討した (Figure 3)。その結果、RFCとPCFTの発現レベルは同程度であり、FR $\alpha$ の発現レベルはRFCおよびPCFTと比較して高いことが示唆された。また、HDACsに関しては、HDAC1-3の発現レベルは同程度であり、HDAC8の発現は1-3と比較して低いことが示唆された。

### 3-3 VPA投与がラット胎盤における葉酸輸送担体およびHDACs発現に及ぼす影響

続いて、妊娠ラットを用いて*in vivo*における検討を行った。HDAC阻害作用を有するVPA (400 mg/kg) を4日間連続経口投与後、ラット胎盤を摘出し解析した。

ラット胎盤におけるrFr $\alpha$ およびrPcftの発現は、妊娠の進行に伴い増大傾向を示すことが示唆された。妊娠期とVPA投与は、全ての葉酸輸送担体の発現に関して、相互作用があることが示された。VPAの投与は、G20におけるrFr $\alpha$ およびrPcftの発現を有意に減少させることが示された。HDACsに関して、妊娠の進行に伴いrHdac2およびrHdac8の発現は減少することが示唆された。また、rHdac1とrHdac3に関して、妊娠期とVPA投与の相互作用が有意であることが示された。VPAはG13におけるrHdac1発現を増加させた一方、G20におけるrHdac1, rHdac3発現を減少させた。

## 4、考察

本研究では、胎盤葉酸輸送担体の発現制御因子としてHDACsに着目し、*in vitro*および*in vivo*において種々検討を行った。

ヒト胎盤モデル BeWo 細胞において、VPA による葉酸輸送担体 (FR $\alpha$ , PCFT) の発現変化には HDAC 阻害作用が関与している可能性が示唆された (Figure 1)。また、BeWo 細胞には、class I に属する HDACs の全てのアイソフォームの発現が確認された (Figure 2A)。また、ヒト胎盤組織においても、class I の全てのアイソフォームの発現が確認された (Figure 2B)。今後、各アイソフォームの寄与について更に詳細な検討を行う予定である。

また、ヒト胎盤組織における発現レベルの解析では、RFC と PCFT は同程度であり、FR $\alpha$  の発現レベルは RFC と PCFT と比較して高いことが示唆された。また、HDACs に関しては、HDAC1-3 の発現レベルは同程度であり、HDAC8 の発現は 1-3 と比較して低いことが示唆された。今後、更にサンプル数を追加し、各葉酸輸送担体発現と HDACs 発現との関連性について検証していく予定である。

*In vivo* の検討において、G20 のラット胎盤における rFra および rPcft mRNA 発現量は、G13 に比較して高い傾向を示した。また、VPA の連続投与は、G20 における rFra および rPcft mRNA の発現を減少させた。一方、G13 における影響は観察されなかったことから、妊娠時期に応じた寄与の評価が今後必要とされる。HDAC に関しては、rHdac2 および rHdac8 の発現は妊娠の進行に伴い減少することが示唆された。VPA は G13 における rHdac1 発現を増加させ、G20 における rHdac1, rHdac3 発現を減少させた。

本研究では、HDAC 阻害剤である VPA は *in vitro* および *in vivo* の両方において、葉酸輸送担体の発現に影響を及ぼす可能性が示された。しかし、各輸送担体の変動の傾向は、*in vitro* と *in vivo* で逆のパターンを示した。この原因について、がん細胞と正常細胞の違い、サイトトロホブラスト細胞とシンシチオトロホブラスト細胞での感受性の違い等が可能性として挙げられる。今後正常ヒト胎盤細胞を用いた検討など、より詳細に検討する必要がある。

## 5、まとめ

本研究では、胎盤の HDAC 活性が FR $\alpha$  や PCFT 等の葉酸輸送担体の発現レベルに影響を及ぼす可能性を *in vitro* および *in vivo* において示した。また、ヒト胎盤絨毛組織における葉酸輸送担体および HDACs の発現を示した。今後は、各 HDAC アイソフォームの寄与率の検証等、より詳細な検討が必要とされる。HDACs は種々の栄養成分や医薬品により活性調節を受けることが知られている。本研究の進展は、個々の妊婦の生活環境に応じた適切な葉酸摂取法の確立、さらには児のリスク低減および予防に向けた戦略へ繋がる可能性がある。

## 6、謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました一般用医薬品セルフメディケーション振興財団ならびに関係者の皆様に心より感謝申し上げます。

## 7、引用文献

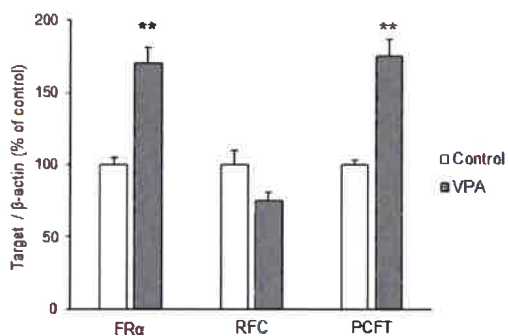
- 1) De-Regil LM, Peña-Rosas JP, Fernández-Gaxiola AC, Rayco-Solon P. Effects and safety of periconceptional oral folate supplementation for preventing birth defects. *Cochrane Database Syst Rev.* 14;(12):CD007950 (2015).
- 2) 厚生労働省「日本人の食事摂取基準」(2020年版)
- 3) Fekete K, Berti C, Trovato M, Lohner S, Dullemeijer C, Souverein OW, Cetin I, Decsi T. Effect of folate intake on health outcomes in pregnancy: a systematic review and meta-analysis on birth weight, placental weight and length of gestation. *Nutr J.* 19;11:75 (2012).
- 4) Hodgetts VA, Morris RK, Francis A, Gardosi J, Ismail KM. Effectiveness of folic acid supplementation in pregnancy on reducing the risk of small-for-gestational age neonates: a population study, systematic review and meta-analysis. *BJOG.* 2015 Mar;122(4):478-90.
- 5) Zhang Q, Wang Y, Xin X, Zhang Y, Liu D, Peng Z, He Y, Xu J, Ma X. Effect of folic acid supplementation on preterm delivery and small for gestational age births: A systematic review and meta-analysis. *Reprod Toxicol.* 67:35-41 (2017).
- 6) Hua X, Zhang J, Guo Y, Shen M, Gaudet L, Janoudi G, Walker M, Wen SW. Effect of folic acid supplementation during pregnancy on gestational hypertension/preeclampsia: A systematic review and meta-analysis. *Hypertens Pregnancy.* 35(4):447-460 (2016).
- 7) Zhao R, Diop-Bove N, Visentin M, Goldman ID. Mechanisms of membrane transport of folates into cells and across epithelia. *Annu Rev Nutr.* 31:177-201 (2011).
- 8) Kurosawa Y, Furugen A, Nishimura A, Narumi K, Kobayashi M, Iseki K. Evaluation of the effects of antiepileptic drugs on folic acid uptake by human placental choriocarcinoma cells. *Toxicol In Vitro.* 48:104-110 (2018).
- 9) Gurvich N, Tsygankova OM, Meinkoth JL, Klein PS. Histone deacetylase is a target of valproic acid-mediated cellular differentiation. *Cancer Res.* 64(3):1079-1086 (2004).

**Table 1 Primer sequences**

Name		Primer sequence	Product size (bp)
Human			
FR $\alpha$ ( <i>FOLR1</i> )	Forward	5'-GCATTTTCATCCAGGACACCT-3'	146
	Reverse	5'-GACAATCTTCCCACCATTGC-3'	
RFC ( <i>SLC19A1</i> )	Forward	5'-CAGCATCTGGCTGTGCTATG-3'	161
	Reverse	5'-TGATGGTCTTGACGATGGTG-3'	
PCFT ( <i>SLC46A1</i> )	Forward	5'-TGAACCTAAGCACACCCCTCT-3'	182
	Reverse	5'-CAAAGGCAAAGACCACCATC-3'	
HDAC1 ( <i>HDAC1</i> )	Forward	5'-CATCGCTGTGAATTGGGCTG-3'	119
	Reverse	5'-CCCTCTGGTGATACTTTAGCAGT-3'	
HDAC2 ( <i>HDAC2</i> )	Forward	5'-CAGTTGCTGGAGCTGTGAAG-3'	139
	Reverse	5'-AATTCAAGGATGGCAAGCAC-3'	
HDAC3 ( <i>HDAC3</i> )	Forward	5'-CCGAAATGTTGCCCGCTGCTG-3'	220
	Reverse	5'-AGGTGCATGGTTCAGCATCTT-3'	
HDAC8 ( <i>HDAC8</i> )	Forward	5'-TTTTCCCAGGAACAGGTGA-3'	179
	Reverse	5'-AGCTCCCAGCTGTAAGACC-3'	
YWHAZ ( <i>YWHAZ</i> )	Forward	5'-CCGTTACTTGGCTGAGGTTG-3'	143
	Reverse	5'-AGTTAAGGGCCAGACCCAGT-3'	
$\beta$ -Actin ( <i>ACTB</i> )	Forward	5'-TGGCACCCAGCACAAATGAA-3'	186
	Reverse	5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA-3'	
Rat			
FR $\alpha$ ( <i>Folr1</i> )	Forward	5'-GCCCAGAGGACAAGTTACA-3'	116
	Reverse	5'-CCAGTTGAATCGGTACAG-3'	
RFC ( <i>Slc19a1</i> )	Forward	5'-CATGCTAAGCGAACTGGTGA-3'	122
	Reverse	5'-TTTTCCACAGGACATGGACA-3'	
PCFT ( <i>Slc46a1</i> )	Forward	5'-CCTTCTGGGAGATTTCAACG-3'	184
	Reverse	5'-CCAGAAAGGGTTGGCATAAC-3'	
HDAC1 ( <i>Hdac1</i> )	Forward	5'-TCTGACAAACGCATTGCCTG-3'	258
	Reverse	5'-AGGGACTTGGAGAGAAGATGGA-3'	
HDAC2 ( <i>Hdac2</i> )	Forward	5'-AATCCAAGGACAATAGTGGTGAG-3'	147
	Reverse	5'-ACTTCCTCAAACAGCGAAGG-3'	
HDAC3 ( <i>Hdac3</i> )	Forward	5'-CCAGATTTACGCTCCATC-3'	126
	Reverse	5'-GACACTGGGTGCATGGTTC-3'	
HDAC8 ( <i>Hdac8</i> )	Forward	5'-ATCGAATCCAGCAAATCCTC-3'	143
	Reverse	5'-TCACAAATCCCACAAACTGC-3'	
$\beta$ -Actin ( <i>Actb</i> )	Forward	5'-CTATCGGCAATGAGCGGTTC-3'	134
	Reverse	5'-GAGGTCTTTACGGATGTCAACG-3'	

Figure 1

(A) VPA



(B) VPM

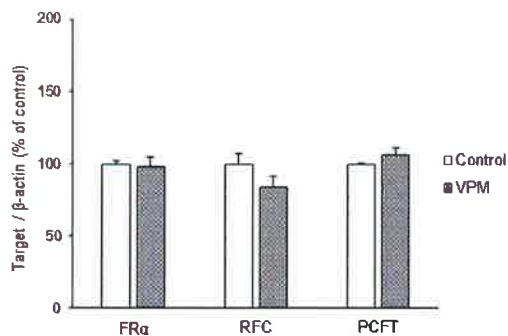


Figure 1 VPA (A) および VPM (B) が BeWo 細胞における葉酸輸送担体 mRNA 発現に及ぼす影響

BeWo 細胞を VPA (1 mM) もしくは VPM (1 mM) で 24 時間処理し、葉酸輸送担体の mRNA 発現量を real-time PCR で解析した。Figure 1 (A) は参考文献 (8) より引用。

Mean with S.E. of three independent experiments. \*\*  $p < 0.01$  compared to the control.

Figure 2

(A) BeWo



(B) Human term placenta

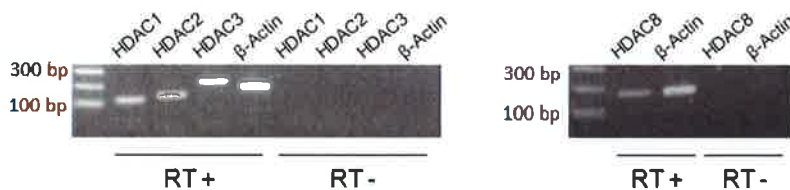


Figure 2 BeWo 細胞 (A) およびヒト胎盤 (B) における HDACs mRNA 発現 (RT-PCR)



Figure 3

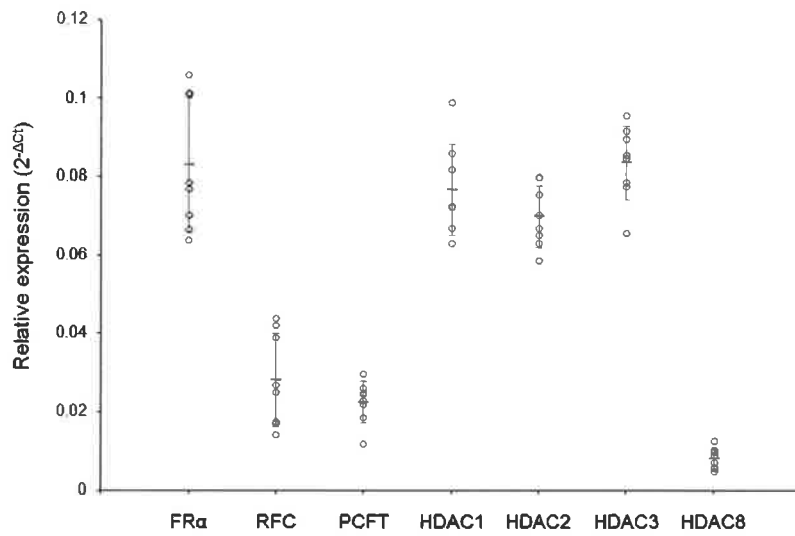


Figure 3 ヒト胎盤絨毛における葉酸輸送担体および HDACs mRNA 発現

葉酸輸送担体および HDACs 発現レベルは real-time PCR で測定した。Reference gene として YWHAZ を使用した。Mean with S.D. (n = 8 placentas)

Figure 4

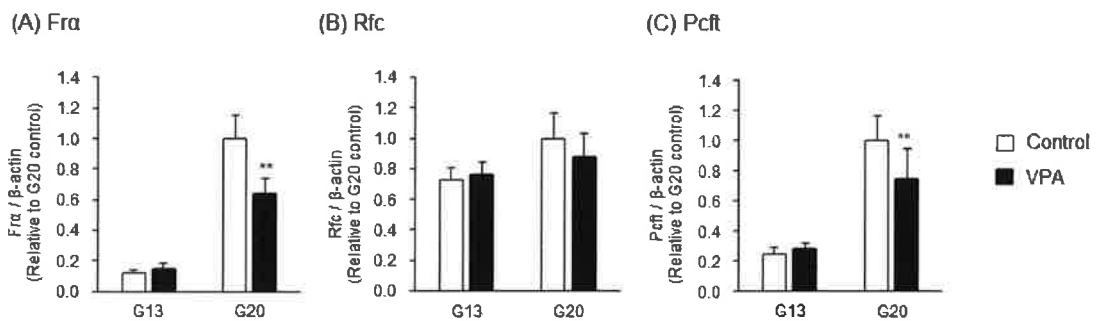


Figure 4 VPA 投与がラット胎盤における葉酸輸送担体 mRNA 発現に及ぼす影響

Mean with S.D. (n = 10–12 placentas from three dams) \*\*  $p < 0.01$  compared to the G20 control. G: gestational day.

Figure 5

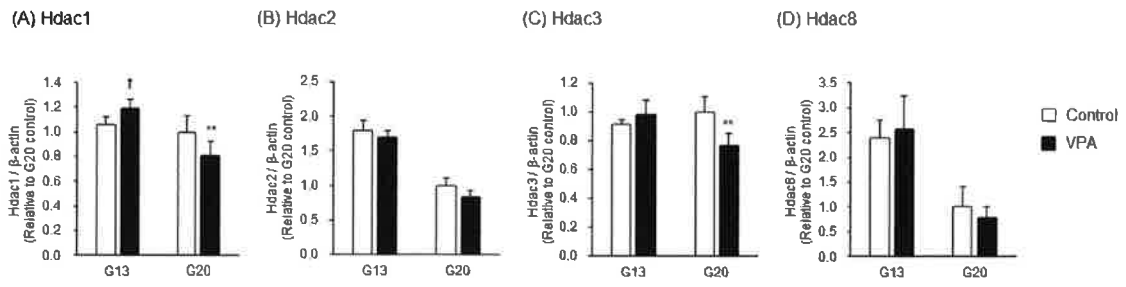


Figure 5 VPA 投与がラット胎盤における HDACs mRNA 発現に及ぼす影響

Mean with S.D. (n = 10–12 placentas from three dams). \*\*:  $p < 0.01$  compared to the G20 control. †:  $p < 0.05$  compared to the G13 control. G: gestational day.