

## 様式 C-19

# 科学研究費補助金研究成果報告書

平成21年 5月22日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18580263

研究課題名（和文） ウシ乳腺上皮細胞のアポトーシス誘導および抑制機構の解明

研究課題名（英文） Studies on the mechanism of apoptosis in bovine mammary epithelial cells

研究代表者

萩野 顕彦 (HAGINO Akihiko)

東北大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：80156249

研究成果の概要：

乳牛の泌乳量は、ミルクを生産する細胞である乳腺上皮細胞の数によって規定される。したがって乳腺上皮細胞の増殖・分化を促進し細胞死（アポトーシス）を抑制することは乳量の増加につながる。成長ホルモンや催乳ホルモン（デキサメサゾン、インスリン、プロラクチン）は、乳腺上皮細胞の増殖・分化を促進しアポトーシスを抑制するが、その作用機構においてIGFBP-3と-5が重要な役割を果たしている可能性が明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,600,000	0	1,600,000
2007年度	900,000	270,000	1,170,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	540,000	3,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 畜産学・草地学

キーワード：家畜生産システム

## 研究開始当初の背景

乳牛の泌乳量は、機能的な乳腺上皮細胞の数に比例すると考えられている。乳腺上皮細胞の数は、泌乳期間を通じて増殖・分化とアポトーシスにより制御されている。泌乳後期の乳量低下を抑制するためには、乳腺上皮細胞の増殖・分化促進とアポトーシス抑制が重要であると考えられる。

乳腺は上皮細胞以外にも繊維芽細胞、脂肪細胞などの間質細胞が混在していることから、乳腺機能の解明には、実質細胞である乳腺上皮細胞を単離・培養して機能解明をすることが必須であり、多くの研究者が培養を試みている。しかし、ウシ乳腺上皮細胞はガン細胞などに比べて増殖能力が低く、培養を続けると機能が変化する場合があるなど、その培養には技術的な問題も多く残されており、さらに細胞の機能を常に把握する必要があるなど多くの労力を有する。そのためか乳腺上皮細胞としての機能を有したまま培養に成功している例は世界的に見ても非常に少ない。

2005年にPubMedで(bovine mammary epithelial cell apoptosis)で検索したら20件ヒットした。この中でウシ乳腺上皮細胞を用いたアポトーシスの研究はわずかに6件であった。これらによるとウシ乳腺上皮細胞のアポトーシス制御にはTGF- $\beta$ が重要な役割を果たしており(Baumrucker et al. J Mammary Gland Biol Neoplasia 4:53-64, 2000)、そのほかにもFIL(feedback inhibitor lactation:ミルクの合成・分泌を制御する因子で乳腺上皮細胞自身から分泌される)、IGFBP-3(insulin-like growth factor binding protein 3)、IGFBP-5(IGFの作用を遮断することによりアポトーシスを誘導する)、Fasリガンド、MDGI(milk-derived growth inhibitor)などがアポトーシスに関与している(Wilde et al. J Mammary Gland Biol Neoplasia 4:129-136, 1999 ほか)。TGF- $\beta$ はautocrine/paracrineにより乳腺上皮に作用し、増殖抑制、分化抑制、アポトーシス誘導を引き起こす(Gajewska et al. J Physiol Pharmacol 56 suppl 3:143-57, 2005)ことから、重要な局所的因子であると思われる。しかしながら、このようなウシ乳腺上皮細胞を用いた研究の必要性は認められながらも、培養の困難さや煩雑さのために、世界的にもこのような研究は非常に少ない状況である。したがって、ウシ乳腺上皮細胞のアポトーシスのメカニズムについての知見も、TGF- $\beta$ に関するいくつかの論文と離乳後の乳腺退行時のアポトーシスについて、細胞外マトリクスとの関係を組織レベルで調べたものがあるもののそのほかに関しては非常に少ない。

## 1. 研究の目的

泌乳最盛期をすぎると乳量が徐々に低下するが、この低下はおもに乳腺上皮細胞数がアポトーシスにより減少することに起因するとされており、この低下を抑制することができれば乳量増加という経済的なメリットだけでなく、泌乳期内の乳量の変化が少なくなり乳牛個体への負担軽減にもつながる。

本研究では、泌乳中後期の乳腺上皮細胞のアポトーシス制御機構を明らかにし、最終的にこのアポトーシスを抑制し持続型の泌乳曲線となるような飼養管理技術の開発や、乳牛育種の指標を提供することを目的とする。

1. 乳腺上皮細胞のアポトーシス制御および増殖・分化制御機構について培養細胞を用いて検討し、アポトーシス制御因子を明らかにするとともに、アポトーシス制御の細胞内機構についても明らかにする。
2. 1より泌乳中後期のアポトーシス制御機構の一端が明らかになると考えられるので、その制御に関連する因子を検索する。

## 3. 研究の方法

- (1) ウシ乳腺上皮細胞の増殖・分化に及ぼす催乳ホルモンの影響

Matrigel および催乳ホルモンにより分化誘導したウシ乳腺上皮細胞の増殖・生存維持に及ぼすホルモン・成長因子の影響を調べた。カゼイン発現は免疫組織化学的に検出し、レーザー顕微鏡で観察した。細胞数の計測にはMTT法を用いた。

- (2) ウシ乳腺上皮細胞のカゼイン合成に及ぼすGHおよび催乳ホルモンの影響

カゼイン遺伝子発現に及ぼすホルモン・成長因子の影響についてRT-PCR法で検討した。

- (3) ウシ乳腺上皮細胞のカゼイン合成に及ぼすコラーゲンI、IVおよびラミニンの影響

ウシ乳腺上皮細胞のカゼイン合成に及ぼす細胞外マトリクスの影響について検討した。カゼインタンパク質量はELISAにて、mRNA発現はRT-PCR法で測定した。

- (4) MAPK、Aktリン酸化に及ぼす成長因子・ホルモンの影響

ウシ乳腺上皮細胞をホルモン・成長因子で刺激後細胞質タンパク質を抽出し、それぞれの抗体を用いたウエスタンブロット法で検討した。

- (5) ウシ乳腺上皮細胞(BMEC)のIGF

結合タンパク質 (IGFBP) 発現に及ぼす GH の影響

ウシ乳腺上皮細胞を成長ホルモンで処理した後ウエスタンリガンドブロット法で検討した。

(6) MAPK、Akt のリン酸化に及ぼす IGF-結合タンパク質-5 (IGFBP-5) の影響

ウシ乳腺上皮細胞を IGFBP-5 で処理した後細胞質タンパク質を抽出し、ウエスタンブロット法で検討した。

(7) デキサメサゾン、インスリンおよびプロラクチン刺激による IGFBPs および IGF-I 受容体発現の変化

ウシ乳腺上皮細胞を各ホルモン・成長因子で処理した後 total RNA を抽出し、RT-PCR および定量的 RT-PCR 法で各遺伝子の発現量を測定した。

#### 4. 研究成果

(1) ウシ乳腺上皮細胞の増殖・分化に及ぼす催乳ホルモンの影響

ウシ乳腺上皮細胞は Matrigel + 催乳ホルモン処理により機能的に分化し、乳腺法要構造を形成し、 $\alpha$ -S1-カゼインを合成・分泌した。この分化した乳腺上皮細胞の生存維持 (アポトーシス抑制) にはデキサメサゾンが重要な役割を果たしていた。デキサメサゾンは生存維持だけではなく、Matrigel 上で培養した細胞の増殖を濃度依存的に促進した。

(2) ウシ乳腺上皮細胞のカゼイン合成に及ぼす GH および催乳ホルモンの影響

$\alpha$ -s1 カゼイン mRNA 発現は GH および催乳ホルモンにより増加した。GHR mRNA 発現は催乳ホルモン処理により増加した。GH および催乳ホルモンによりカゼインの分泌は増加した。

(3) ウシ乳腺上皮細胞のカゼイン合成に及ぼすコラーゲン I、IV およびラミニンの影響

コラーゲン IV およびラミニンコート上で培養したときの乳腺上皮細胞のカゼイン分泌は、コラーゲン I コート上培養に比べて有意に増加した。

(4) MAPK、Akt リン酸化に及ぼす成長因子・ホルモンの影響

IGF-I、GH 刺激時の細胞増殖およびアポトーシス抑制重要な役割を果たしている細胞内因子である MAPK および Akt のリン酸化の変化に及ぼすインスリン様成長因子-I (IGF-I)、成長ホルモン (GH) の影響について、それぞれの特異抗体を用いた Western blot 法により解析をおこなった。IGF-I は Akt のリン酸化を増加させ、GH はその作用を増強した。

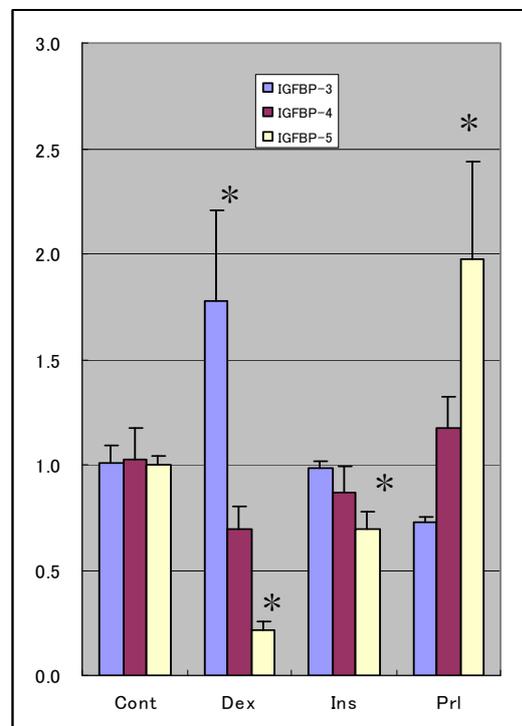
(5) ウシ乳腺上皮細胞 (BMEC) の IGF 結合タンパク質 (IGFBP) 発現に及ぼす GH の影響

Western ligand blot 法により検討した。GH は IGFBP-3 の発現には影響しなかったが、IGFBP-5 の発現を遺伝子レベルおよびタンパク質レベルで抑制した。

(6) MAPK、Akt のリン酸化に及ぼす IGF-結合タンパク質-5 (IGFBP-5) の影響

Western blot 法で検討した結果 IGFBP-5 は IGF-I による Akt リン酸化増加を抑制した。このことは、IGFBP-5 がウシ乳腺上皮細胞のアポトーシス制御において重要な役割を果たしている可能性を示している。

(7) デキサメサゾン、インスリンおよびプロラクチン刺激による IGFBPs 発現の変化  
デキサメサゾン、インスリンおよびプロラクチン刺激により IGFBP-3 発現の量は約 3.5 倍に増加し、IGFBP-5 は逆に 1/4 以下に減少した。IGFBP-2、-4 および IGF-I 受容体発現はほとんど変化しなかった。デキサメサゾンは単独で IGFBP-3 発現を増加し IGFBP-5 発現を抑制したことから、催乳ホルモンの作用はおもにデキサメサゾンの作用によるものと考えられる。以上の結果より、催乳ホルモンにより IGFBP-3 と -5 発現が大幅に変化したことから、乳腺での IGFBP-3 および -5 発現が、乳腺上皮細胞の分化過程においてなんらかの役割を果たしているのではないかと考えられる。



IGFBP-3, 4, 5 mRNA 発現に及ぼすデキサメサゾン (Dex)、インスリン (Ins)、プロラクチン (Pr1) 24 時間処理の影響 (\*: P < 0.05)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Sakamoto K, Yano T, Kobayashi T, Hagino A, Aso H, Obara Y.

Growth hormone suppresses the expression of IGFBP-5, and promotes the IGF-I-induced phosphorylation of Akt in bovine mammary epithelial cells.

Domest Anim Endocrinol. 2007 May, 32(4):260-272

(査読有)

〔学会発表〕(計 1 件)

萩野顕彦、大谷喜永、加藤和雄 「ウシ乳腺上皮細胞のIGF結合タンパク質発現に及ぼす催乳ホルモンの影響」日本畜産学会第110回大会 2009年3月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

萩野 顕彦 (HAGINO Akihiko)  
東北大学・大学院農学研究科・助教  
研究者番号：80156249

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

小田 伸一 (ODA Shinichi)  
岩手大学・農学部・准教授  
研究者番号：60211827