

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792666

研究課題名（和文） 妊婦・授乳婦への薬物投与可否のスクリーニングに関する検討

研究課題名（英文）

A screening for judgment of drug administration to pregnant and lactation women

研究代表者

千葉 健史（CHIBA TAKESHI）

岩手医科大学・薬学部 助教

研究者番号：80552926

研究成果の概要（和文）：

母乳育児は、乳児および母親の両者に対して多くの利点をもたらすことが明らかとなっている。しかしながら、母親が妊娠期および授乳期に使用する薬物の乳腺に与える影響は、適切な母乳育児を行う上で重要な問題であるにも関わらず、その可能性を評価できるスクリーニング法はない。本研究では、ヒト乳腺上皮細胞株 MCF-12A を用いた実験系を構築するとともに、その実験系が、乳腺の授乳期機能に対する薬物の影響を評価できる実験系として有用であることを示した。

研究成果の概要（英文）：

Breastfeeding has many benefits for both infants and mothers. However, if one medication taken by mothers during pregnancy and lactation influences the specific function of mammary gland, optimal breastfeeding might be disturbed. It is therefore important to determine whether a drug influences its function or not. We show in the present study that our cell culture model using MCF-12A is useful to assess the effects of therapeutic drugs on the mammary function in human.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	1,300,000	390,000	1,690,000

研究分野：医療系薬学

科研費の分科・細目：看護学・生涯発達看護学

キーワード：乳腺、母乳、セロトニン、選択的セロトニン再取り込み阻害剤、 β -カゼイン

1. 研究開始当初の背景

(1) 母乳育児の重要性

母乳は、人工乳に比べて栄養バランスに優れており、乳児および母親の両者に対して多くの利点をもたらすことが明らかになっている。母乳で育った乳児は、人工乳で育った乳児に比べて身体発育や神経発達が盛んに行われる^{1, 2}。また、初乳に多量に含まれる IgA は、抗菌作用や免疫促進作用を有することから、乳児に対する喘息発症率の低下や、感染症予防効果を示すこと等が報告されている³。一方、母乳を与えた母親に対しても、分娩後のうつ病予防に関連するリラクゼー

ション効果に加え、卵巣癌、骨粗鬆症の発症率を低下させること等が報告されている⁴。このため、近年、母乳育児の重要性は再認識され、アメリカ小児科学会やカナダ小児科学会をはじめとする多くの学術機関によって推奨されている。

(2) 乳腺組織に対する薬物の影響

乳腺は、妊娠中に種々ホルモンの作用によって著しい機能発達を遂げ、授乳期には母乳産生等の特異的な機能を獲得する。しかし、薬物の中にはその授乳期乳腺機能に影響を及ぼすものが存在する。痛風治療剤のコルヒ

チンや抗悪性腫瘍剤のツプロゾールは、母乳タンパクの一つであるカゼインの産生を強く抑制することが動物研究によって明らかにされている^{5, 6}。また、唯一のヒト臨床研究によって、抗うつ剤として現在世界で広く使用されている選択的セロトニン再取り込み阻害剤 (Selective serotonin reuptake inhibitor:SSRI) を妊娠中に服用していた授乳婦では、母乳分泌時期が遅延することが報告されており⁷、SSRI が妊娠期における乳腺の機能発達に影響を与え、ひいては、授乳期乳腺機能を抑制する可能性も示唆されている。このように、妊娠期や授乳期に服用した薬物によって乳腺の機能発達並びに授乳期乳腺機能が障害されれば、母乳保育が妨げられる可能性があり、それにも関わらず、その影響を評価できるスクリーニング法は存在しない。そこで本研究では、乳腺の機能発達並びに授乳期機能に対する影響を評価できる細胞培養実験系の構築を試みた。

(3) 参考文献

- ① Mortensen EL., et al. (2002) JAMA., 287: 2365-2371.
- ② Fergusson D. M., et al. (1999) Paediatr Perinat Epidemiol., 13:144-157.
- ③ Ruiz-Palacios GM., et al. (1990) J. Pediatr., 116:707-713.
- ④ Anderson PO. (1991) Clin Pharm., 10:594-624
- ⑤ Sordillo LM., et al. (1984) Int J Biochem., 16:1135-41
- ⑥ Servely JL., et al. (1987) Biol Cell., 59:121-7
- ⑦ Marshall AM., et al. (2010) J Clin Endocrinol Metab., 95, 837-846.

2. 研究の目的

本研究の目的は、薬物が乳腺の機能発達および授乳期乳腺機能に影響を与えるか否かを評価できる、ヒト培養細胞を用いた実験系を確立し、妊婦・授乳婦への薬物の投与可否のスクリーニングに利用することである。そのような評価を可能にするためには、実験系に用いる培養細胞が授乳期機能を有し、かつ、その機能制御に関与することが明らかな内因性物質に対して応答性を有する実験系を構築することが必要と考えられる。本研究では、実験系に用いる細胞に、ヒト乳腺上皮細胞株である MCF-12A を選択した。また、母乳タンパクの一つであり、乳腺上皮細胞の機能分化や授乳期機能の指標として用いられている β -カゼインに着目し、これを指標として MCF-12A の授乳期機能を評価した。さらに、授乳期機能の制御に関与することが明らかな内因性物質としてプロラクチン (PRL) およびセロトニン (5-HT) を用い、これらの β

-カゼイン発現に対する影響についても評価した。加えて、構築した実験系の有用性の評価を行うため、ヒト臨床研究によって、唯一、乳腺の機能発達および授乳期乳腺機能に影響を及ぼす可能性が示唆されている SSRI に着目し、これを実験系に添加した際の影響についても評価した。

3. 研究の方法

(1) 細胞

細胞は、正常細胞の特性を保持し、かつ種々研究に汎用されている非腫瘍性ヒト乳腺上皮細胞株の MCF-12A を用いた。

(2) マトリゲルコートした dish および plate の作成

凍結マトリゲル (BD Biosciences) を 4°C で解凍後、氷冷下、Phosphate Buffer Saline (PBS) 溶液で 250 μ g/mL に希釈し、コーティング溶液とした。コーティング溶液は、60 mm dish、100 mm dish、および 24 well プレートに、それぞれ 6.6 mL、18.2 mL、および 590 μ L 添加し、37°C で 1 時間インキュベートした。その後、クリーンベンチ内で数分間放置し、余分な溶液を除去した。最後に、コーティング部分を PBS 溶液で洗浄し、乾燥させた。

(3) 培養方法

培地は、DMEM/F-12 (1:1) に 20 ng/mL hEGF、10 μ g/mL bovine insulin、5% horse serum、0.5 μ g/mL hydrocortisone、0.1 IU/mL penicillin、0.1 mg/mL streptomycin を添加し、増殖用培地とした。ただし、上記添加物の他に、セロトニン (5-HT) あるいは SSRI を添加する場合は、horse serum を除いた。

細胞は、上記 (2) の方法で作成した dish あるいは plate に 10⁴ cell/cm² で播種し、2 日に 1 回培地交換を行った。

(4) MTT 試験

MTT 試験は、培養 1、7、14、21、28 日目に行った。MTT を Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) に溶解し、MTT ストック溶液 (5 mg/mL) を調製した。その後、PBS 溶液でさらに希釈し、MTT 溶液 (0.5 mg/mL) を調製した。

培養 1、7、14、28 日目に、培地を除去し、HBSS で洗浄後、MTT 溶液を加え、CO₂ インキュベーター内で 4 時間インキュベートした。その後、溶液を除去し、DMSO:2-propanol 混液 (1:1) を加えて、一晩放置した。翌日、その溶液を採取し、570 nm における吸光度を測定した。

(5) 定量的 RT-PCR

細胞からの Total RNA の抽出には RNeasy

Mini kit (Qiagen) を用いた。逆転写反応には High Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems) を用い、マニファクチャープロトコールに従って、cDNA を合成した。また、各遺伝子における定量的 RT-PCR には、TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems)、TaqMan Universal Master Mix II (Applied Biosystems) を用い、7500 リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) で増幅反応を行った。

(6) ウェスタンブロッティング

細胞から M-PER mammalian protein extraction reagent (Thermo Scientific) を用いてタンパク質を抽出し、各サンプルを BCA Protein Assay kit (Pierce) を使って定量した。SDS-PAGE 法により 7.5%あるいは 12.5%ゲルで、サイズ分画した後、セミドライ法により Polyvinylidene Difluoride 膜 (PVDF 膜) に転写した。さらに、この PVDF 膜を適当な一次抗体で、2 時間反応させた後、HRP 標識抗 IgG 抗体 (1 : 2000) とともに 2 時間インキュベートし、ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) を用いて検出した。

4. 研究成果

(1) MCF-12A の細胞増殖と授乳期機能の発現

まず始めに、細胞の増殖特性を MTT 試験によって評価した。その結果、細胞は培養 14 日目まで増加し、培養 21 日目まで生存性が維持され、28 日目では生存性が低下した。

生体内における乳腺上皮細胞は、妊娠期に増殖し、その後、授乳期に母乳産生機能を獲得することから、次に我々は、培養 14 日目と 21 日目の細胞に着目し、両細胞における β -カゼインの発現量について、定量的 RT-PCR 法およびウェスタンブロッティング法を用いて比較した。その結果、 β -カゼインの発現は、mRNA およびタンパク質レベルで観察され、それらの発現はいずれも培養 14 日目より 21 日目まで有意に高かった。また、プロラクチン受容体 (PRLr) の発現量についても同様に比較したところ、培養 14 日目より 21 日目まで増加傾向が観察された。

以上の結果から、MCF-12A は、授乳期乳腺機能を有する細胞株であり、21 日間培養することによって、機能分化をより進んだ状態に誘導することが可能になると考えられた。このことから、以後の検討は 21 日間培養した細胞を用いることとした。

(2) MCF-12A の内因性物質に対する応答性に関する検討

① β -カゼインの発現に対するプロラクチン (PRL) の影響

PRL は、生体内において母乳産生を増加させ

るホルモンの一つである。また、 β -カゼインは、PRL が PRLr に結合し、転写因子である signal transducer and activator of transcription 5 のリン酸化を経て産生が促進される。本検討項目では、PRL (0.01、0.1 μ g/ml) を培養 14 日目に添加し、その後 7 日間継続培養した細胞における β -カゼインの発現量、および β -カゼインの発現に関連するリン酸化 STAT5 (p-STAT5) の発現量について、ウェスタンブロッティング法により評価した。その結果、両者の発現量は、PRL 添加濃度に依存して増加した (図 1)。

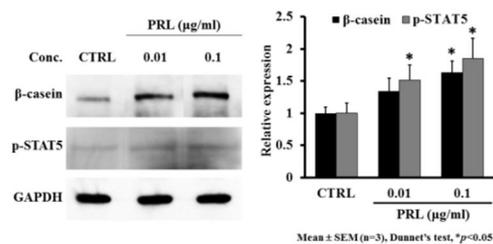


図 1 β -カゼインの発現に対する PRL の影響

② β -カゼインの発現に対するセロトニン (5-HT) の影響

5-HT は、生体内において母乳産生を抑制することが知られている生理活性物質の一つである。本検討項目では、5-HT (0.01、0.1 mM) を培養 21 日目に添加し、その後 3 日間継続培養した細胞における β -カゼインおよび p-STAT5 の発現量をウェスタンブロッティング法により評価した。その結果、0.1 mM 5-HT 処理した細胞において、 β -カゼインおよび p-STAT5 の発現量は有意に低下した。(図 2)。

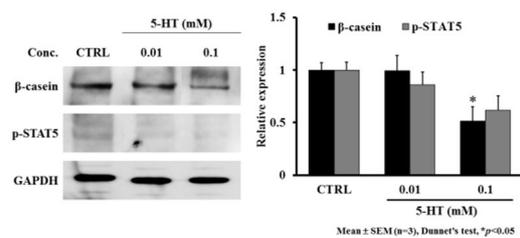


図 2 β -カゼインの発現に対する 5-HT の影響

以上の結果から、MCF-12A を用いた実験系への PRL 添加によって母乳タンパクの発現量は増加し、逆に、5-HT の添加によって母乳タンパクの減少が観察されたことから、本実験系は、内因性物質に対する応答性を有する実験系であることが示唆された。また、5-HT による β -カゼインの発現抑制には、p-STAT5 の抑制が関与していることが明らかとなった。

(3) SSRI s を用いた実験系の有用性に関する

検討

上記でも述べたが、SSRIs は、ヒト臨床研究によって、授乳期乳腺機能を抑制する可能性が示唆されている。本検討項目では、MCF-12A を用いた本実験系が、授乳期乳腺機能に対する薬物の影響を評価できる実験系として有用であるかどうかを評価するため、日本で汎用されている3つのSSRIs (フルボキミンマレイン酸塩:FLV、パロキセチン塩酸塩 PRX、セルトラリン塩酸塩:SRT) を用い、 β -カゼイン、p-STAT5 の発現量に対する影響について、ウェスタンブロッティング法により評価した。なお、3つのSSRIs (いずれも1 μ M) は、培養21日目に添加し、その後3日間暴露させた。その結果、3つのSSRIs (1 μ M) は、いずれも β -カゼインおよび p-STAT5 の発現を抑制した。これらの結果によって、SSRIs は MCF-12A の母乳タンパク発現を抑制することが明らかとなった。また、この結果は、ヒト臨床研究における結果との関連性を示しており、本実験系が薬物の影響を評価できる実験系として有用であると考えられた。また、SSRIs による β -カゼインの発現抑制には、p-STAT5 の抑制が関与していることが示唆された (図3)。

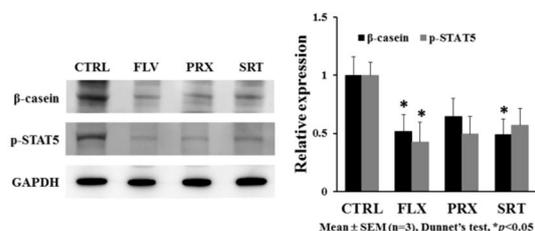


図3 β -カゼインの発現に対するSSRIsの影響

(4) 今後の課題と展望

本研究を通して、MCF-12A を用いた実験系が、授乳期乳腺機能に対する薬物の影響を評価できる実験系として有用であることが明らかとなったが、5-HT や SSRIs による β -カゼインの発現抑制における詳細なメカニズムを明らかにするまでには至らなかった。今後、5-HT や SSRIs による p-STAT5 の抑制における詳細なメカニズムの解明が期待される。また、SSRIs は内因性セロトニン動態に影響を与える薬物であることから、本実験系で観察された SSRIs による β -カゼインの発現抑制に、細胞外セロトニン量の増加が関与しているかどうかについても明らかにされる必要がある。

妊娠期や授乳期に服用した薬物によって、乳腺の機能発達や授乳期機能が障害されれば、母乳保育が妨げられる可能性がある。従って、授乳期乳腺機能に対する薬物の影響を評価することは、妊婦・授乳婦への薬物投与

可否を考慮する上で重要と考えられる。本研究は、その薬物投与可否に関する、これまでに例のないスクリーニング法の確立へ向けて、扉を開くものであり、その点において意義がある。また、本実験系は、細胞培養という手法を用いているため、SSRIs だけにとどまらず、今後、他の薬物のスクリーニング評価はもちろんのこと、がん発生研究や化学物質に対する毒性研究等、様々な分野へ応用されるものと期待される。

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)

[学会発表] (計6件)

①八重樫彩花、千葉健史、木村聡一郎、藤原邦彦、上田秀雄、森本雍憲、高橋勝雄、ヒト乳腺上皮細胞株 MCF-12A を用いたフルボキミンによる授乳期乳腺機能抑制機構に関する検討、日本薬学会第133年会、平成25年3月30日、パンフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

②千葉健史、木村聡一郎、手塚優、井上範昭、橋本香奈、上田秀雄、高橋勝雄、森本雍憲、乳腺上皮細胞の機能分化および授乳期特異的機能に対するフルボキサミンの影響—MCF-12A を用いた in vitro 細胞培養系による検討—、第39回日本毒性学会学術年会、平成24年7月17日、仙台国際センター (宮城県仙台市)

③木村聡一郎、千葉健史、橋本香奈、上田秀雄、高橋勝雄、森本雍憲、ヒト乳腺上皮細胞株 MCF-12A の増殖および機能分化に対するセロトニンの影響、日本薬学会第132年会、平成24年3月29日、北海道大学 (北海道札幌市)

④千葉健史、木村聡一郎、橋本香奈、上田秀雄、高橋勝雄、森本雍憲、乳腺上皮細胞の機能分化に対する選択的セロトニン再取り込み阻害薬の影響、日本薬学会第132年会、平成24年3月29日、北海道大学 (北海道札幌市)

⑤野々内明日香、千葉健史、木村聡一郎、幅野渉、西郡秀夫、上田秀雄、高橋勝雄、森本雍憲、ヒト乳腺上皮細胞株 MCF-12A を用いたセロトニンによる授乳期機能分化の制御に関する検討、日本薬学会第131年会、平成23年3月30日、ツインメッセ静岡 (静岡県静岡市)

⑥千葉健史、野々内明日香、木村聡一郎、幅野渉、西郡秀夫、上田秀雄、高橋勝雄、森本雍憲、ヒト乳腺上皮細胞株 MCF-12A における授乳期機能分化に対する選択的セロトニン再取り込み阻害剤の影響、日本薬学会第131年会、平成23年3月29日、ツインメッセ静岡 (静岡県静岡市)

〔その他〕

本研究を通して達成された教育実績 2
件：井上範昭「乳腺上皮細胞の機能分化に対するフルボキミンの影響」、平成 24 年度、岩手医科大学薬学部/八重樫彩花「乳腺上皮細胞の機能分化および授乳期機能に対するセロトニン再取り込み阻害剤の影響」、平成 25 年度、岩手医科大学薬学部

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千葉 健史 (CHIBA TAKESHI)
岩手医科大学・薬学部・助教
研究者番号：80552926

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

高橋 勝雄 (TAKAHASHI KATSUO)
岩手医科大学・名誉教授
研究者番号：50453296
森本 雍憲 (MORIMOTO YASUNORI)
城西大学・薬学部・教授
研究者番号：90001057
上田 秀雄 (UEDA HIDEO)
城西大学・薬学部・准教授
研究者番号：50326998
木村 聡一郎 (KIMURA SOICHIRO)
城西大学・薬学部・助教
研究者番号：30433650
井上 範昭 (INOUE NORIAKI)
岩手医科大学・薬学部
八重樫 彩花 (YAEGASHI AYAKA)
岩手医科大学・薬学部