

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450441

研究課題名(和文) 温度感受性TRPチャネルを介した乳汁分泌調節機序に関する研究

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of milk secretion by temperature-sensitive TRP channels

研究代表者

小林 謙 (Kobayashi, Ken)

北海道大学・農学研究院・准教授

研究者番号：30449003

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：温度感受性TRPチャネルとは、多様な細胞に発現している温度センサーの一種である。泌乳期の乳腺上皮細胞では中高温度域で活性化するTRPV4と低温度域で活性化するTRPM8が発現している。そこで乳腺上皮細胞の乳分泌を生体外で再現した培養モデルを用いて、両TRPチャネルの活性化を化学的に誘導し、その影響を調べた。その結果、TRPV4の長期的な活性化は乳腺上皮細胞を減少させ、その乳分泌能力を低下させていた。また、TRPM8の長期的な活性化は乳腺上皮細胞の細胞数には影響せず、その乳産生能力を低下させた。乳腺上皮細胞周囲の温度変化は、これらのTRPチャネルを活性化し、乳汁分泌を制御すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Temperature-sensitive TRP channels are function as peripheral temperature sensors expressed in several cells. During lactation, mammary epithelial cells express TRPV4 and TRPM8, which are activated at warm and cool temperature, respectively. However, it remains unclear whether TRPV4 and TRPM8 are involved in milk secretion in mammary epithelial cells. In this study, we activated the TRPV4 and TRPM8 by using specific chemical agonists in the culture model of lactating mammary epithelial cells. The results showed that activation of TRPV4 decreased the cell number and inhibited milk production in the mammary epithelial cells. TRPM8 activation also down-regulated the milk secretion ability of the mammary epithelial cells without the decrease in cell number. These results indicate that milk secretion of the mammary epithelial cells is regulated by surrounding temperature through activation of TRPV4 or TRPM8.

研究分野：上皮組織の細胞生物学

キーワード：乳分泌 乳腺上皮細胞 TRPチャネル TRPM8 TRPV4 乳成分 温度受容体

1. 研究開始当初の背景

体温を感知する生体温度センサーは、温度依存的な生理反応の調節に必要不可欠であり、長らくその正体が不明のままであった。しかし、1997年に中高温度域を感知する温度センサーとして、TRPV1が発見された(文献1)。TRPV1は感覚神経に発現しており、42度以上の温度で開口するカルシウムチャンネルであった。その後、温度依存的に活性化するTRPチャンネルは次々と同定され、現在では9種類が報告されている。これらの温度感受性TRPチャンネルは特定の温度域で活性化し、生体内の幅広い温度変化に対応する(文献2)。温度感受性TRPチャンネルは、上皮性の細胞にも発現している。特に膵臓、唾液腺、前立腺など分泌性の上皮細胞に発現する温度感受性TRPチャンネルは、その分泌能、バリア機能、細胞死等にも関与する。しかし、泌乳期乳腺で乳汁を分泌する乳腺上皮細胞にどのTRPチャンネルが発現し、どのような役割を果たしているかわかっていない。

泌乳牛の乳房は外気温の影響を受けやすく、乳成分の合成に伴う代謝熱も発生する。そのため、乳房温度は活発に変化する。乳腺はその乳房温度の変化に対して敏感に反応し、その乳汁分泌能を変化させる。外気温が27度を超える暑熱ストレス下において、泌乳牛の体温は平常時よりも上昇し、乳量低下、乳成分異常、体細胞数増加などの症状が認められる。また、寒冷ストレス下でも乳汁分泌能は低下する。ヒトの乳汁分泌過多症の対処療法としても乳房の局所的冷却が行われている。現在、これら乳房温度変化にともなう乳汁分泌能の変動原因としてルーメン内の発酵不良、食欲低下および代謝量の変化などが挙げられている。しかし、乳腺に発現する温度感受性TRPチャンネルが乳汁分泌異常の一因になっている可能性がある。なぜなら、泌乳期の乳腺上皮細胞にも4種類の温度感受性TRPチャンネルが発現していることが確認されたからである。特にTRPV4とTRPM8はそれぞれ、中高温度域と低温度域で活性化するTRPチャンネルであり、暑熱ストレスや寒冷ストレスを感知するセンサーとして機能している可能性がある。

哺乳動物が産生する乳量とその成分組成は、『乳腺上皮細胞の総数』に『乳腺上皮細胞の各乳成分産生能力』を乗じた値として算出される(文献3)。乳分泌細胞の総数は、増殖細胞数から死細胞数を差し引いた値であり、乳成分産生能力は、その成分合成に関わるタンパク質群の発現パターンが決定する。乳分泌細胞を取り巻く様々な生理的要因が、細胞の増殖性やタンパク質発現パターンを調節している(文献4)。また、乳腺上皮細胞は、乳汁分泌の開始とともに乳成分の漏出や感染を防ぐため、強固なタイトジャンクション(TJ)によるバリア(血液乳関門、Blood-Milk Barrier)を形成する(文献5)。したがって、泌乳期乳腺における乳腺上皮細胞

の主要な役割として、乳成分産生とバリア形成が挙げられる。一方、唾液腺や前立腺の分泌性上皮細胞において、温度感受性TRPチャンネルがその分泌能とTJバリアを調節することが示されている。しかし、泌乳期の乳腺上皮細胞に存在する温度感受性TRPチャンネルが乳成分産生とバリアの形成に及ぼす影響はわかっていない。

2. 研究の目的

本研究では、泌乳期の乳腺上皮細胞に発現する2種類の温度感受性TRPチャンネル(TRPV4、TRPM8)が乳成分産生とバリアの形成に及ぼす影響を調べ、暑熱・寒冷ストレスにおける乳異常の発症メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 乳分泌培養モデルの作製

非妊娠のICRマウス(♀, 9-12週齢)より摘出した乳腺組織を細切後、0.75 mg/ml collagenaseを含むRPMI1640培地に浸漬して酵素処理した。乳腺組織を分散させた後、ウシ胎児血清を用いた密度勾配遠心法を行い、乳腺上皮細胞を回収した。増殖培地(10 ng/ml EGF、10 µg/ml insulin、10% FBSを含むRPMI1640培地)に懸濁し、高密度で播種した後、6日間培養した。続いて、分化培地(10 ng/ml EGF、10 µg/ml insulin、1 µM dexamethasone、0.5 U/ml prolactin、1% FBSを含むRPMI1640培地)に交換し、2日間分化誘導した後、実験に供試した。

(2) TRPV4、TRPM8発現パターンの検証

マウスの泌乳期乳腺と培養した乳腺上皮細胞におけるTRPV4とTRPM8の発現パターンを調べるため、RT-PCR、免疫染色、およびウエスタンブロッティングを行った。なお、免疫染色は冷メタノールと1%ホルムアルデヒド固定した乳腺凍結切片と培養細胞を用いて行った。

(3) TRPV4、TRPM8の活性化の検証

乳腺上皮細胞に発現するTRPV4とTRPM8の活性化を検出するため、カルシウム蛍光プローブであるFluo-8AMを用いたライブイメージングを行った。コラーゲンコートしたGlass Bottom Dishに播種した乳腺上皮細胞を分化誘導した後、4 µM Fluo-8AMを含みFBSを含まない分化培地で60分間処理し、細胞内にFluo-8AMを取り込ませた。その後、フェノールレッドとFBSを含まない分化培地で洗浄した後、38℃、5%CO₂に設定したステージトッピングキュベーターに置き、10分間静置した。温度が安定化した後、共焦点顕微鏡を用いて、520 nmの蛍光強度を5分間測定した。続いて、TRPV4のagonist(GSK1016790A、4α-PDD)もしくはTRPM8のagonist(Menthol、WS 12)を培地に添加し、添加後の蛍光強度の変化を測

定した。

(4) 乳成分産生能の評価

分化誘導した乳腺上皮細胞の培地に TRPV4 と TRPM8 の agonist を添加し、一定時間処理した後にサンプリングし、乳成分産生能に及ぼす影響を定量 PCR、ウエスタンブロットリング、および免疫染色によって調べた（実験方法の詳細は文献 6 参照）。

(5) TJ 構成タンパク質とバリア機能の検証

分化誘導した乳腺上皮細胞に TRPV4 と TRPM8 の agonist を処理し、TJ 構成タンパク質である Claudin-1, -3, -4, -7 および Occludin の発現量と局在に及ぼす影響を免疫染色とウエスタンブロットリングにより調べた。また、TJ のバリア機能は、Cell Culture Insert 上に乳腺上皮細胞を播種し、その経上皮電気抵抗値の測定（Millicel-ERS system）により評価した。

4. 研究成果

(1) TRPV4、TRPM8 発現パターン

泌乳期乳腺における乳腺上皮細胞と分化誘導した乳腺上皮細胞における TRPV4 と TRPM8 の発現について、RT-PCR とウエスタンブロットリングで調べた結果、両 TRP チャンネルの発現が *in vivo* と *in vitro* で確認された。その局在を免疫染色で観察したところ、TRPV4 は乳腺上皮細胞の細胞膜頭頂部側に局在しており、筋上皮細胞や脂肪細胞に陽性反応は認められなかった（図 1 左上）。TRPM8 も乳腺上皮細胞の細胞膜頭頂部側に多く観察され、加えて細胞種は同定できなかったが、間質側に存在する一部の細胞にも陽性反応が認められた（図 1 左下）。培養して分化誘導した乳腺上皮細胞における TRPV4 の局在は頭頂部側の細胞膜に観察され、TJ の存在する Apical most region 近傍に集中している細胞も観察された（図 1 右上）。一方、TRPM8 は一部の乳腺上皮細胞の頭頂部側細胞膜に観察され、TRPM8 陰性の細胞も多く

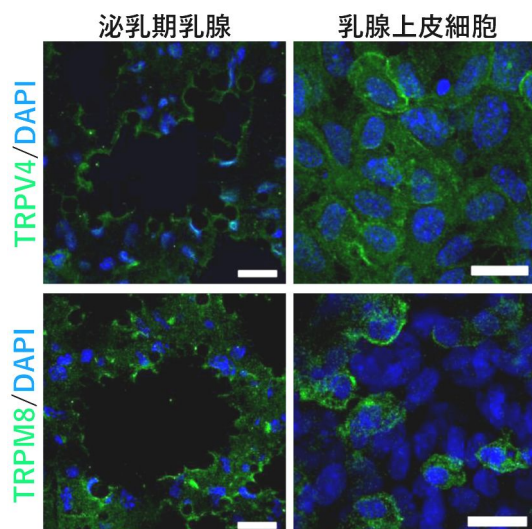


図1 TRPV4とTRPM8の免疫染色像

存在していた（図 1 右下）。以上の結果から、泌乳期乳腺において乳産生を行う乳腺上皮細胞には TRPV4 と TRPM8 が発現していること、および本研究で供試する乳分泌培養モデルの乳腺上皮細胞にも両温度受容体が発現していることが確認された。

(2) TRPV4、TRPM8 の活性化の検出

本研究では TRPV4 と TRPM8 の活性化を誘導するため、TRPV4 の agonist (100 nM GSK1016790A、5 μ M 4 α -PDD)、および TRPM8 の agonist (200 μ M Menthol、10 μ M WS12) を用いた。これらの agonist が乳分泌培養モデルの乳腺上皮細胞を活性化していることを確認するため、Fluo-8AM を用いたカルシウムイメージングを行った。共焦点顕微鏡でライブイメージングを行った結果、培地にこれらのアゴニストを添加して数秒後に、520 nm における蛍光強度が一過性に上昇することが確認された（図 2）。

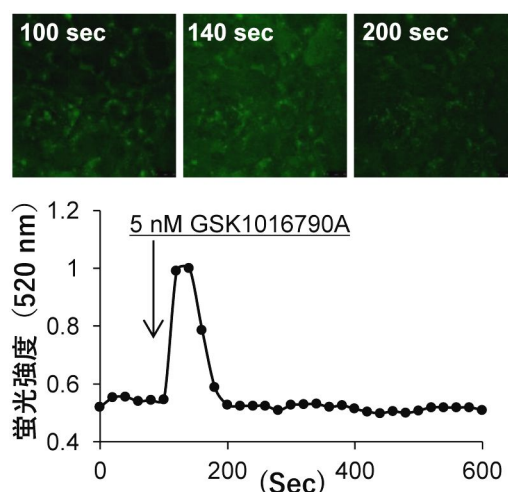


図2 Fluo-8による細胞内カルシウム測定

(3) 乳成分産生能へ及ぼす影響

TRPV4 と TRPM8 の活性化が乳腺上皮細胞の乳産生能力に及ぼす影響を調べるため、代表的な乳タンパク質である β -カゼインの細胞内量と培地への分泌量をウエスタンブロットリングで調べた。4 α -PDD 処理した乳腺上皮細胞では培養 1 日後に細胞内と培地中 β -カゼイン量がやや増加していた（図 3 上）。一方、GSK1016790A で処理した場合、培養 1 日後に細胞内と培地中の β -カゼイン量は減少していた。培養 3 日後にはどちらで処理した場合でも細胞内と培地中の β -カゼインはほとんど検出されなかった。また、4 α -PDD で処理した場合は 3 日後に、GSK1016790A で処理した場合には 1 日後から β -アクチン量が減少していた。以上のことから、TRPV4 の活性化は一時的に β -カゼインの産生量を促進することも示唆されたが、TRPV4 の活性化が長期間続いた場合、乳腺上皮細胞数は減少し、その乳産生能力も低下すると考えられた。乳腺上皮細胞を Menthol 存在下で 1 日間培養した結果、培地中の β -カゼイン量は

やや増加していた(図3下)。しかし、処理3日後には培地中のβ-カゼインは減少していた。WS12で活性化した場合には処理1日後から細胞内および培地中のβ-カゼイン量は減少し、培養3日後にはその減少がやや緩和していた。TRPM8の活性化はβ-アクチン量へはほとんど影響していなかった。以上のことから、TRPM8の活性化は細胞数に影響せずに乳腺上皮細胞の乳産能力を低下させると考えられた。

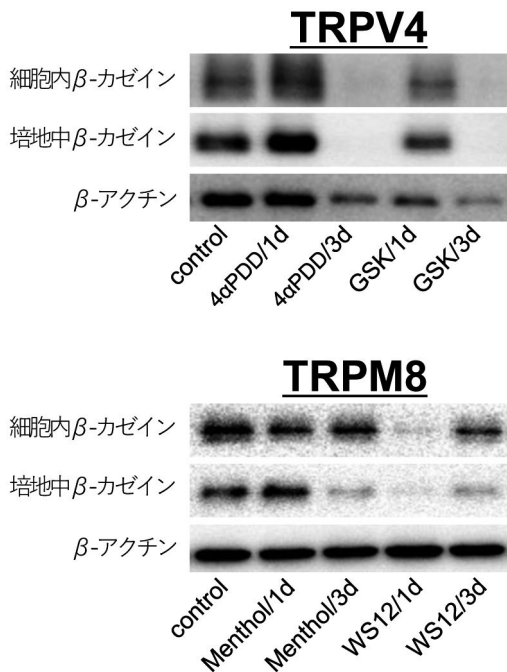


図3 β-カゼインのウエスタンブロッティング像

(4) TJ 構成タンパク質へ及ぼす影響

泌乳期の乳腺上皮細胞において、正常な TJ は Claudin-3 を主体としているが、乳房炎時や離乳後に乳腺が退行し始めた際には、Claudin-4 が増加する(文献 7、8)。そこでウエスタンブロッティングにより、TRPV4 と TRPM8 の活性化が両 Claudin 量に及ぼす影響を調べた。乳腺上皮細胞を 4α-PDD で処理すると、Claudin-4 量はほとんど変化せずに Claudin-3 が増加していた(図4上)。一方、GSK1016790A で処理した場合には両 Claudin ともに減少していた。TRPM8 の agonist である Menthol と WS12 で処理した場合、培養3日後には Claudin-3 と-4 が増加していた(図4下)。そこで WS12 で3日間処理した乳腺上皮細胞における Claudin-3、-4 および Occludin の局在を免疫染色で調べた。その結果、WS12 で処理した乳腺上皮細胞では Claudin-3 が細胞質に分散しており、細胞膜以外の局在が増加している様子であった(図5上段)。Claudin-4 の場合、未処理の乳腺上皮細胞では染色性が弱く局在も不明瞭であったが、WS12 で処理した場合には明瞭に細胞間に局在している様子が観察された(図5中段)。また、Occludin は WS12

で処理した場合も未処理の場合も TJ の存在する Apical Most region に集中して局在していた(図5下段)。

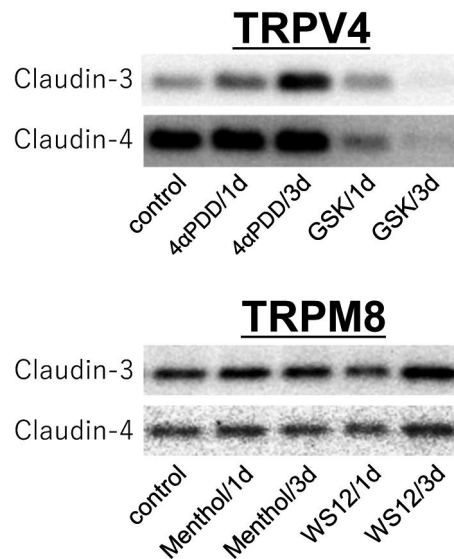


図4 Claudinのウエスタンブロッティング像

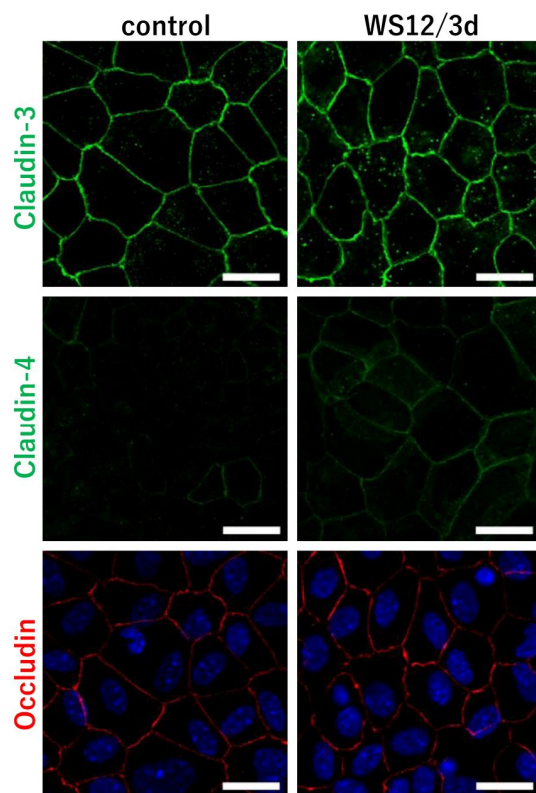


図5 TJ構成タンパク質の免疫染色像

(5) TJ のバリア機能へ及ぼす影響

TRPM8 の活性化は Claudin 量を増加させたが、局在パターンは乳房炎時に近い様子であった(文献 8)。そこで TJ のバリア機能を評価するため、経上皮電気抵抗値を測定した。その結果、処理直後から48時間後までの間、Menthol 処理した乳腺上皮細胞では経上皮電気抵抗値が低下しており、Menthol 処理が一時的に TJ のバリア機能を低下させていることが示唆された(図6)。

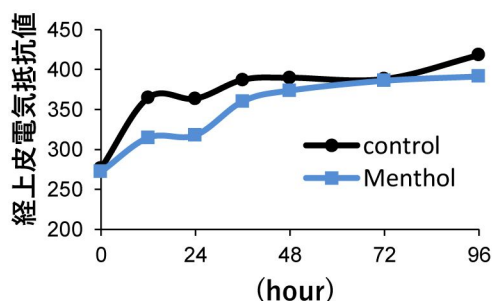


図6 メントール処理後の経上皮電気抵抗値

(6) まとめ

以上のことから、泌乳期乳腺における乳腺胞上皮細胞は TRPV4 と TRPM8 を発現しており、その活性化は乳成分産生能力や TJ に影響を及ぼすことが分かった。TRPV4 と TRPM8 はそれぞれ中高温度域と低温度域で活性化する温度センサーである。したがって、暑熱ストレスや寒冷ストレスにともなう乳産生能力の低下や体細胞数の増加はこれらの温度感受性の TRP チャンネルが関与していると考えられる。

< 引用文献 >

- Caterina MJ et al, *Nature*, 389: 816-824. 1997.
- Moran MM et al, *Nat Rev Drug Discov*, 10: 601-620. 2011.
- Herve L et al. *J Dairy Sci*, 99: 854-863. 2016.
- Knight CH et al. *J Dairy Sci*, 70: 1991-2000. 1987.
- Nguyen DA et al, *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 3: 233-246. 1998.
- Kobayashi K et al, *Vet Res*, 44: 119. 2013.
- Kobayashi K et al, *Histochem Cell Biol*, 136: 587-594. 2011.
- Kobayashi K et al, *PLoS One*, 8: e62187. 2013.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Baumgartner HK, Rudolph MC, Ramanathan P, Burns V, Daniel T, Webb P, Stein T, Kobayashi K, Neville MC (2017). Developmental Expression of Claudins in the Mammary Gland. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. in press. 査読有
DOI: 10.1007/s10911-017-9379-6.

Kobayashi K, Oyama S, Kuki T,

Tsugami Y, Matsunaga K, Suzuki T, Nishimura T (2017). Distinct roles of prolactin, epidermal growth factor, and glucocorticoids in β -casein secretion pathway in lactating mammary epithelial cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 440, 16-24. 査読有
DOI: 10.1016/j.mce.2016.11.006.

Kobayashi K, Tsugami Y, Matsunaga K, Oyama S, Kuki T, Kumura H (2016). Prolactin and glucocorticoid signalling induces lactation-specific tight junctions concurrent with β -casein expression in mammary epithelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Research*, 1863, 2006-2016. 査読有
DOI: 10.1016/j.bbamcr.2016.04.023.

Kobayashi K, Kuki T, Oyama S, Kumura H (2016). Pro-inflammatory cytokine TNF- α is a key inhibitory factor for lactose synthesis pathway in lactating mammary epithelial cells. *Experimental Cell Research*, 340, 295-304. 査読有
DOI: 10.1016/j.yexcr.2015.10.030.

Uejyo T, Oyama S, Kuki T, Kumura H, Kobayashi K (2015). Early down-regulation of milk production after weaning by pup removal and prior to involution in mouse mammary glands. *Cell and Tissue Research*, 359, 643-653. 査読有
DOI: 10.1007/s00441-014-2013-7.

[学会発表](計12件)

Oyama S. Effect of prolactin, EGF and dexamethasone on mechanism for regulating β -casein expression and secretion. The 2014 Annual Meeting The American Society for Cell Biology, 2014年12月15日発表, Philadelphia (USA).

Kobayashi K. Differential roles of prolactin and glucocorticoid in mammary alveolar tight junction formation during lactation in mice. The 2014 Annual Meeting The American Society for Cell Biology, USA, 2014年12月15日発表, Philadelphia (USA).

小林 謙. 温度変化が乳腺上皮細胞の乳成分産生能力に及ぼす影響. 日本畜産学会第122回大会. 2017年3月29日発表. 神戸大学(兵庫県・神戸市)

津上優作. イソフラボンが乳腺上皮細胞の乳産生へ及ぼす影響. 日本畜産学会第122回大会. 2017年3月29日発表. 神戸大学(兵庫県・神戸市)

松長康太. 炎症性サイトカインが乳腺上皮細胞の乳成分産生に及ぼす影響. 日本畜産学会第122回大会. 2017年3月29日発表. 神戸大学(兵庫県・神戸市)

小林 謙. 暑熱ストレスによる体温上昇は乳腺上皮細胞の乳分泌能とバリア機能に影響を及ぼすか? 第21回日本乳房炎研究会学術集会. 2016年10月7日発表. 国立科学博物館(東京都・台東区).

津上優作. イソフラボンの種類により乳腺上皮細胞の乳産生とタイトジャンクションに及ぼす影響が異なる. 第21回日本乳房炎研究会学術集会. 2016年10月7日発表. 国立科学博物館(東京都・台東区).

津上優作(2015). イソフラボンが乳腺上皮細胞のβ-カゼイン産生とタイトジャンクションに及ぼす影響. 第20回日本乳房炎研究会学術集会. 2015年10月9日発表. 国立科学博物館(東京都・台東区).

小林 謙. 乳腺上皮細胞のin vitro培養モデルに関する検証. 第20回日本乳房炎研究会学術集会. 2015年10月9日発表. 国立科学博物館(東京都・台東区).

小林 謙. 泌乳期乳腺のタイトジャンクション形成におけるプロラクチンと糖質コルチコイドの役割. 日本畜産学会第120回大会. 2015年9月11日発表. 酪農学園大学(北海道・江別市).

小林 謙. Lipopolysaccharide 投与によって引き起こされる泌乳期乳腺の早期反応. 第19回日本乳房炎研究会学術集会. 2014年10月10日発表. 南青山会館(東京・港区).

九鬼千夏. 炎症性サイトカインが乳腺上皮細胞の乳糖産生経路に及ぼす影響. 第19回日本乳房炎研究会学術集会. 2014年10月10日発表. 南青山会館(東京・港区).

〔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〕

ホームページ等

http://www.agr.hokudai.ac.jp/cell_tissue_biology/

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 謙(Ken Kobayashi)

北海道大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号: 30449003