

令和元年6月11日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08064

研究課題名(和文)牛乳腺組織における5-HT-PTHrP系の泌乳に対する役割

研究課題名(英文)Function of 5-HT-PTHrP system to lactation in the bovine mammary gland

研究代表者

恩田 賢(ONDA, Ken)

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号：70308302

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：牛の乳腺と胎盤における副甲状腺ホルモン関連タンパク質(PTHrP)と5-ハイドロキシトリプトミン(5-HT, 別名セロトニン)の発現調節とミネラル輸送について検討した。牛乳腺由来の培養細胞であるbMEC細胞が、5-HTの輸送体であるSERTを発現し細胞内に5-HTを取り込むことが明らかとなった。また、BMGE+H細胞は、培地中のカルシウム濃度を何らかの方法で感知し、濃度依存性にPTHrP分泌量を増加させることが分かった。胎盤においては母体側の胎盤由来PTHrPが、胎子のミネラル栄養に影響を与えている可能性が示唆された。また、乳熱の発症に対するPTHrPの直接的な関与は明らかでなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳類が生きていくためには胎生期においては胎盤から、新生子期においては乳腺から栄養を供給される必要がある。実験動物においても明らかにされていない泌乳のメカニズム、特にミネラルトランスポートに関して、泌乳量の増加を目的に遺伝的改良が行われてきた乳牛において知見が得られたことは、今後の高齢化社会においても重要なカルシウム供給源である牛乳生産に応用することが期待できる。また乳熱の病態に対する微量ミネラルの関与が明らかになれば、疾病予防や治療にも応用することが可能かもしれない。

研究成果の概要(英文)：This study investigated the influence of 5-HT-PTHrP system to the lactogenesis in the mammary gland and to the mineral transport in the placenta of dairy cows. We found the gene expression of SERT, transporter of 5-HT, in bMEC cells which derived from bovine mammary gland and bMEC cells can reuptake 5-HT. Another bovine mammary gland cells, BMGE+H cells can sense the change of Ca concentrations in media and secrete PTHrP with dose dependent manner. PTHrP detected from umbilical cord blood indicated that placenta secreted PTHrP into fetal circulation and can influence to the fetal growth. We cannot demonstrate the participation of PTHrP derived from the mammary gland and the placenta to the occurrence of milk fever in dairy cows.

研究分野：獣医内科学

キーワード：PTHrP 牛 泌乳 カルシウム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

乳牛の周産期に発生する乳熱は泌乳によるカルシウム (Ca) の喪失が原因で生じる。低 Ca 血症になった際には副甲状腺の Ca 受容体 (calcium sensing receptor, CaSR) がそれを感じ、副甲状腺ホルモン (parathyroid hormone, PTH) を分泌することによって血中の Ca 濃度をセットポイントに回復させる。さらに泌乳期乳腺自体に存在する CaSR もその刺激に反応し、副甲状腺ホルモン関連タンパク質 (parathyroid hormone-related protein; PTHrP) を合成分泌することによりカルシウム恒常性の維持を図っていることが明らかとなった。さらに近年、乳腺上皮細胞に貯留した乳汁による伸展刺激がニューロトランスミッターとして知られる 5-ハイドロキシトリプタミン (5-hydroxytryptamine, 5-HT, serotonin) の合成を促進すること、さらに 5-HT が PTHrP の発現を増加させることによって Ca 代謝に関与することが指摘されている。5-HT は乳腺での乳汁の貯留と除去のサイクルにおいて乳汁の産生を抑制するフィードバック因子と考えられてきた。しかし現在では 5-HT は、異なるいくつかの受容体を介することによって、泌乳と泌乳停止という全く逆の作用、両方に関与することが推測されている。乳腺組織では血小板で知られるようなセロトニン化は確認されず、受容体の種類があまりに多く、また培養系で効果を示す濃度が非生理的ともいえる高濃度であることから、5-HT-PTHrP 系の泌乳に対する関与と重要性に関わる研究は必ずしも進んでいるとは言えない。

## 2. 研究の目的

### (1) 5-HT と Ca の刺激によって乳腺組織の PTHrP 合成は変化するのか？

乳腺で合成される 5-HT はオートクライン・パラクライン作用により、乳蛋白質遺伝子の発現抑制やアポトーシスによる上皮細胞の除去と再生等、基本的には泌乳の抑制シグナルとして乳腺局所でのみで作用すると考えられてきた。それに対して乳腺組織自体が PTHrP を抹消血液中に分泌するという事は、Ca 濃度を上昇させることによって泌乳を維持・継続するためであり、これまでの考えに矛盾する。このことを検討するために、牛乳腺培養細胞を用いて 5-HT と Ca の PTHrP 発現に対する影響を検討した。

### (2) 胎盤に発現する PTHrP は胎児へのミネラル輸送に関与するのか？

乳腺は新生子に対する栄養供給源であるが、胎盤は胎子に対する唯一の栄養供給源であり、胎子の発育のためには Ca だけではなく、リン (P) や微量ミネラルも十分に供給されることが必要である。先行研究で臍帯血液に PTHrP が含まれていることが知られているが、産生部位や胎子のミネラル動態への影響は不明である。そこで、胎盤においても PTHrP が胎子への Ca 輸送に関与しているのか、さらにはこれまで測定されていない微量ミネラル濃度に対する影響を検討した。

### (3) 乳熱発症牛の乳汁ミネラル濃度変化に PTHrP は影響するのか？

通常血液中では非常に低濃度である PTHrP だが、分娩後に泌乳を開始すると乳腺組織での PTHrP 遺伝子発現は急激に上昇し、血液中の 1000 倍以上の高濃度で乳汁中に分泌される。しかし、このような大きな濃度差が生じてまで PTHrP を乳汁に分泌する理由は、いまだ不明である。乳牛の周産期疾患である乳熱は、乳汁合成のための急激で大量のカルシウムの喪失に対して、骨吸収の遅れが主因で生じるカルシウム恒常性維持の破綻によって発症する。そこで、乳熱発症牛の乳汁ミネラル濃度に対して PTHrP が影響与えているのか健康牛と比較検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 乳腺

牛乳腺組織由来の以下の 3 種類の培養細胞を用いて、実験を行った。bMEC 細胞 (Yonezawa et al., J. Dairy Sci. 87(8):2527-34, 2004)、BMGE 細胞 (Schmid et al., J. Cell Biol. 96(1):37-50, 1983)、MAC-T 細胞 (Huynh et al., Exp. Cell Res. 197(2):191-9, 1991)。最初に 5-HT の合成や代謝にかかわる酵素、受容体などの発現を検討し、その後培地中への 5-HT 添加や Ca 濃度の変化に対する PTHrP 分泌への影響を観察した。

### (2) 胎盤

乳牛の帝王切開時に臍帯動静脈と母牛の血液、胎盤節 (胎子側と母体側) の組織などを採取した。得られた血液の PTHrP や、主要および微量ミネラルの濃度、組織においては PTHrP はじめ関連する各種遺伝子の発現状況を観察した。

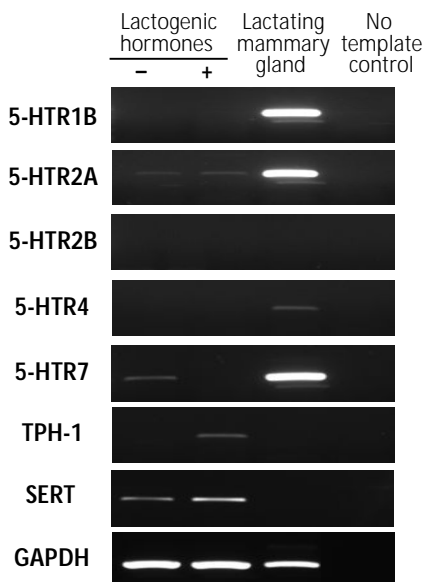
### (3) 乳汁

分娩当日、あるいは翌日において血清 Ca 濃度が低下し起立不能を呈した乳熱罹患牛の乳汁を採取し PTHrP 濃度を測定した。さらに主要なミネラルである Ca や P、微量ミネラルの濃度も測定し、健康牛の乳汁と比較検討した。

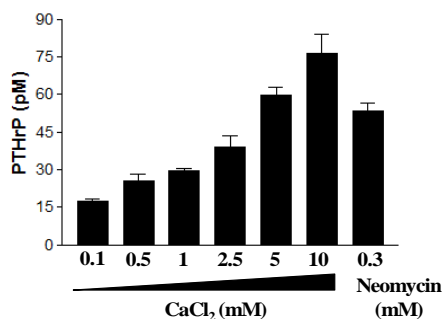
## 4. 研究成果

### (1) 乳腺

bMEC 細胞においては泌乳誘導ホルモン添加の有無に関わらず PTHrP と Lf は発現するが、-CN、-CN、-LA、-LG などの発現は認められなかった。5-HT 受容体遺伝子については、泌乳誘導ホルモンの有無に関わらず 5-HTR2A が発現していたが、5-HTR 7 は無添加時でのみ発現した。また、5-HT 合成の律速酵素である TPH-1 は、ホルモン添加の条件でのみ発現がみられ、5-HT 輸送体である SERT は泌乳誘導ホルモンの有無に関わらず bMEC 細胞において発現が確認された。しかし、TPH-1 と SERT の発現が泌乳期乳腺組織で確認出来ず、これまでの報告と一致しなかった(右図)。泌乳誘導ホルモン添加した条件で bMEC 細胞に 5-HT を添加し、継時的に培地を採取して 5-HT 濃度を測定した。その結果、添加した 5-HT は 9 時間後から減少し、48 時間後には培地中にはほとんどなくなった。細胞が存在しないマイクロプレート内では 5-HT は 48 時間後においてもほとんど減少することはない、SERT を介して細胞内に取り込んだ可能性がある。



BMGE-H 細胞と BMGE+H 細胞を 0.1 ~ 10 mM までの 6 段階の異なる Ca 濃度で培養し、培養液中の PTHrP 濃度を測定した。



その結果、BMGE-H は Ca 濃度に反応せず、PTHrP をほとんど分泌していなかったのに対して、BMGE+H は、Ca 濃度が増加するにつれて PTHrP の分泌も濃度依存的に増加した(左図)。

今回の研究から、BMGE+H は BMGE-H と異なり、培地中の Ca 濃度を何らかの方法で感知し、濃度依存的に PTHrP 分泌量を増加させることが分かった。これらのことから、BMGE+H は泌乳期乳腺上皮細胞よりも、腫瘍細胞に近い性質を持っていることが明らかとなった。

### (2) 胎盤

PTHrP は母牛の血液では検出されなかったが、胎子静脈血と臍帯動静脈血からは 4 pM 程度で検出された。また、Ca と iP の濃度は母体頸静脈よりも胎子の血液中で優位に高い値であった(下図)。また、胎子静脈血中において PTHrP 濃度は、P は Ca とコバルト(Co)の濃度に対して負の相関が認められた

Table 4. Concentrations of plasma parathyroid hormone-related protein (PTHrP), serum calcium (Ca), and serum inorganic phosphorus (iP) in Caesarian section cows and fetus. n = 10. Mean ± SD

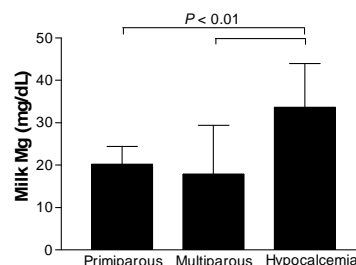
	Dam		Fetus	
	jugular vein	jugular vein	umbilical	
			vein	artery
PTHrP, pmol/L	ND	4.6 ± 1.5	4.1 ± 1.1	4.3 ± 1.4
Ca, mg/100 mL	9.1 ± 1.4a	13.5 ± 1.5b	13.8 ± 1.6b	13.5 ± 0.7b
iP, mg/100 mL	5.4 ± 1.0a	7.5 ± 1.2b	7.5 ± 2.2b	7.3 ± 1.7b

ND: not detected.

( $P < 0.05$ )。さらに胎盤における PTHrP 遺伝子の相対発現量は、母体側で胎子側よりも有意に高かった( $P < 0.05$ )。これらのことから、母体側の胎盤由来 PTHrP は胎子のミネラル代謝に影響を与えている可能性が示唆された。

### (3) 乳汁

分娩当日でも分娩翌日でも、乳熱発症牛の血清 Ca 濃度は非発症牛よりも有意に低値を示したが、乳汁中 PTHrP 濃度に差は認められなかった。乳汁中ミネラル濃度においては、乳熱発症牛でマグネシウム(Mg)のように有意に高値を示すものが複数観察された(右図)。乳熱の発症に対する PTHrP の関与は明確に出来なかったが、乳熱罹患牛の乳汁中微量ミネラルの変動は本疾患の病態に影響する可能性があり、今後の検討が必要である。



## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計3件)

恩田賢, 安念かなこ, 宮坂敬弘, 宇根有美, 佐藤礼一郎. ビタミンD過剰症が疑われたホルスタイン種成雌牛の一例. 臨床獣医. 査読無. 36(10): 8-12, 2018.

Ken Onda, Reiichiro Sato, Yosuke Sasaki, Hiroo Madarame, Hideharu Ochiai, Kazuhiro Kawai and Fujiko Sunaga. Serum Ornithine Carbamoyltransferase Activity and Correlation with Fatty Liver in Dairy Cows with Displaced Abomasum. American Journal of Animal and Veterinary Sciences. 査読有. 11(3): 85-90, 2016.

Abd Eldaim MA, Hashimoto O, Ohtsuki H, Yamada T, Murakami M, Onda K, Sato R, Kanamori Y, Qiao Y, Tomonaga S, Matsui T, Funaba M. Expression of uncoupling protein 1 in bovine muscle cells. Journal of Animal Science. 査読有. 94(12): 5097-5104, 2016.

### 〔学会発表〕(計3件)

飯高 史帆, 風間 啓, 田山 穰, 村田 俊輔, 恩田 賢. ウシ乳腺由来培養細胞のカルシウム濃度の違いに対する副甲状腺ホルモン関連タンパク質分泌の変化. 日本畜産学会第125回大会(神奈川・相模原) 225, 2019年3月29日.

Kei Kazama, Reiichiro Sato, Takuma Nishio, Kazuki Suemoto, Sachiko Arai, Ken Onda. Influence of the placental parathyroid hormone-related protein for parturient disorders in dairy cows. The 30th World Buiatrics Congress (Sapporo, Japan) 313, 2018年8月29日.

末元和輝, 西尾卓馬, 杉田和俊, 佐藤礼一郎, 恩田賢. ホルスタイン種乳牛における母子間と臍帯動静脈血間のミネラル濃度の差異. 第160回日本獣医学会学術集会(鹿児島) 449, 2017年9月15日.

### 〔図書〕(計1件)

恩田賢. 病態からみた牛の輸液, 鈴木一由・山田裕編著. 「2. 電解質異常, 2-3. カルシウム」, 「5. 成牛疾病の病態と輸液療法, 5-2. 乳熱の輸液」. 139-160, 293-300, 2016.

### 〔産業財産権〕

#### 出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年:  
国内外の別:

#### 取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年:  
国内外の別:

### 〔その他〕

ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者 なし

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。