

令和元年6月12日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18953

研究課題名(和文) 母乳育児の推進を目指した母乳中セロトニンの生理的役割と意義の解明

研究課題名(英文) Investigation of physiological roles of serotonin in human milk

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、まず始めに、乳腺上皮細胞における母乳産生制御に関与している5-HTの詳細な分子メカニズムについて検討を行った。その結果、5-HTは、5-HT<sub>7</sub>受容体を介して、脱リン酸化酵素の一つであるProtein-tyrosine phosphatase 1Bの発現誘導を引き起こし、母乳タンパク質の一つである $\kappa$ -カゼイン発現を抑制していることを明らかにした。続いて、健康授乳婦を対象に、母乳中5-HT濃度の生理的変動について調べたところ、母乳中の5-HT濃度は、授乳前後に大きな変動は認められないが、成乳に比べて初乳で高いことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、5-HTを介した母乳産生制御における分子基盤を明らかにし、この成果は「母乳が出ない」という悩みを抱えている母親に対する改善手段や新たな治療薬の開発につながる可能性を秘めていると考えられる。また、本研究により得られた、ヒト母乳中に5-HTが含まれているという事実と、その濃度が成乳に比べて初乳で高いという情報は、今後、母乳中の5-HTが乳児へどのような影響を与えているのかを評価すること、さらには、より有益性の高い人工乳を開発する上で重要な情報源になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We found that 5-HT suppressed  $\kappa$ -casein expression via the induction of protein-tyrosine phosphatase 1B downstream of the 5-HT<sub>7</sub> receptor in human mammary epithelial cells. Additionally, we established a method for quantifying 5-HT concentration in human milk and investigated physiological changes of 5-HT in human milk. Our results showed that 5-HT concentrations in colostrum milk tended to be higher than that of mature milk, although 5-HT concentrations did not change before and after breastfeeding.

研究分野：医療系薬学

キーワード：母乳 セロトニン 乳腺上皮細胞  $\kappa$ -カゼイン

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

### 1. 研究開始当初の背景

母乳育児は、母子双方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。母乳は人工乳に比べて栄養学的に優れ、分泌型 IgA 等の免疫グロブリンも含んでいることから、乳児の様々な器官の発達を促すとともに、感染症の発症リスクを軽減することが報告されている。さらに、母親に対しても、母乳育児は分娩後のうつ病予防効果をもたらし、卵巣がんや骨粗鬆症の発症リスクを低下させることも報告されている。このような利点から、母乳育児は、国際連合児童基金 (UNICEF) や世界保健機構 (WHO) を含む多くの公的機関や学術団体によって推奨されている。

生理活性物質であるセロトニン (5-HT ; Hydroxytryptamine) は、多くの組織で合成され、体内において様々な役割を果たしている。乳腺では、母乳産生を担う乳腺上皮細胞が 5-HT を合成しており、その 5-HT を母乳中へ分泌していることが分かっている<sup>1</sup>。また、母乳中の 5-HT は、母乳産生の制御に関与していることが報告されているが<sup>2</sup>、その詳細な分子メカニズムは明らかにされていない。また、乳幼児は、常に母乳とともに 5-HT を服用している。これまで、母乳中の様々な成分が乳幼児に多くの利益を与えている事実を鑑みると、母乳中の 5-HT が乳幼児の発達等に何らかの利益をもたらしている可能性は高いと考えられる。しかしながら、母乳中の 5-HT が乳幼児にもたらす影響については全く分かっていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、5-HT による母乳産生制御における分子基盤の解明を行うとともに、ヒト母乳中の 5-HT 濃度を調べ、さらには、その 5-HT が乳幼児の発達に対してどのような役割を果たしているのかについて調べることににより、母乳中に含まれる 5-HT の生理的役割と意義を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞培養

非腫瘍性ヒト乳腺上皮細胞株 MCF-12A は、Matrigel<sup>®</sup>でコーティングしたディッシュに  $1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で播種した。培養液には、10 µg/mL ヒトインスリン、0.5 µg/mL ヒドロコルチゾン、20 ng/mL ヒト上皮成長因子 (hEGF)、5%ウマ血清、100 IU/mL ペニシリン及び 0.1 mg/mL ストレプトマイシンを添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) /F-12 を用い、これを増殖用培地 (GM) とした。また、GM から hEGF を除去し、0.1 µg/mL プロラクチンを添加したものを分化用培地 (DM) とした。

細胞を播種後、GM で 24 時間培養した後、DM に切り替えて、さらに 6 日間培養した。また、5-HT または dibutyl cAMP は、培養 7 日目に添加した。PKA 阻害剤 (KT5720、EMD Millipore) および PTP1B 阻害剤 (sc-222227、Santa Cruz Biotechnologies) は、5-HT で 48 時間処理された細胞に対して、5-HT と共にそれぞれ添加し、24 時間インキュベートした。

#### (2) 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、各試料のタンパク質濃度を BCA protein assay kit (Pierce) を使って定量した。また、タンパク抽出液と濃縮サンプルバッファー溶液を用いて、サンプル溶液を調製した。一定量のサンプル溶液を 7.5% または 12.5% ポリアクリルアミドゲルにアプライし、電気泳動を行った後、フッ化ポリビニルデン膜 (PVDF 膜) に電氣的に転写した。転写後、PVDF 膜をブロックエース水溶液 (雪印メグミルク) 中に浸し、4°C の条件下で一晩放置した後、目的に応じた 1 次抗体および 2 次抗体と反応させた。検出試薬には、ECL Prime Western Blotting System (GE ヘルスケア) を用い、LAS-3000 (富士フイルム) を用いて検出した。

#### (3) ヒト母乳の採取

ヒト母乳中に含まれる 5-HT 濃度の生理的変動を調べるために、岩手医科大学附属病院で出産し、かつ本研究への参加同意が得られた 20~40 歳の健康授乳婦を対象に母乳を採取した。ただし、研究期間中に、医薬品やサプリメント等を摂取した女性は解析対象から除外した。

授乳前後における母乳中 5-HT 濃度の変動に関する検討では、11 名の健康授乳婦から同意を得た。母乳の採取は、出産後約 3 ヶ月目にあたる任意日に、授乳直前、授乳 1~2 時間後、次回授乳直前の連続 3 回行った。また、授乳期間における母乳中 5-HT 濃度の変動に関する検討では、5 名の健康授乳婦から同意を得た。母乳の採取は、出産 5~6 日後 (初乳) 1 ヶ月後、3 ヶ月後、6 ヶ月後、離乳後、の計 5 回行った。なお、本検討は、岩手医科大学医学部倫理審査委員会の承認を得て実施した。

母乳試料は、被験者が自ら遠沈管 (50 ml) に 5~10 mL 採取し、自宅冷凍庫 (-20°C) で一時保存後、岩手医科大学臨床薬剤学講座へ郵送 (-20°C) された。郵送された母乳試料は、直ちに凍結保存 (-80°C) された。

#### (4) 固相抽出カラムを用いた母乳からの 5-HT 抽出

一定量の母乳に 10% トリフルオロ酢酸を加えて混合し、遠心後 (12,000 rpm、4 分、10 分) 上清を採取した。1% ギ酸含有メタノール溶液と 0.1% ギ酸水溶液であらかじめコンディショニングした固相抽出カラム (Supel-Select SCX SPE カラム、SPELCO) に上清をアプライし、

0.1% ギ酸水溶液で洗浄後、5% アンモニウム含有メタノール溶液で溶出した。溶出液を蒸発乾固した後、内部標準物質（プロカイン塩酸塩）含有水溶液で再溶解し、サンプル溶液とした。

#### (5) 高速液体クロマトグラフィーによる 5-HT の定量

5-HT の分析に使用した高速液体クロマトグラフィー (HPLC) には、LC-20AD ポンプ、RF-10AXL 蛍光検出器（励起波長：280 nm、蛍光波長：340 nm）、CBM-20A コントローラー、および CTO-20A カラムオープンを装備した Prominence システム（島津製作所）を用いた。移動相には、1 mM オクタンスルホン酸ナトリウム含有酢酸緩衝液 (pH 6.8) とメタノールの混合液 (1:1) を用いた。また、分析カラムには、Sim-pack VP-ODS C18 カラム (5 μm、150×4.6 mm、島津製作所) を用い、流速 1.5 mL/min、カラムオープン 37°C の条件下で分析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 5-HT による β-カゼイン発現の抑制メカニズム

これまで我々は、MCF-12A における 5-HT による β-カゼイン発現の抑制には、5-HT<sub>7</sub> 受容体と、Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 5 (Jak2/STAT5) 経路における STAT5 のリン酸化の阻害が関与していることを報告してきた<sup>3,4</sup>。5-HT<sub>7</sub> 受容体は、Gs タンパク質共役型受容体として知られていることから、本研究では、まず始めに、Gs タンパク質と共役する Protein kinase A (PKA) および cAMP に着目し、これらの因子が、MCF-12A における 5-HT を介した β-カゼイン発現の抑制に関与しているのかを検討した。その結果、β-カゼインおよびリン酸化 STAT5 の発現量の減少を引き起こす 30 μM 5-HT で処理した細胞では、PKA の活性化が確認された。また、cAMP の誘導体であるジブチル cAMP で処理した細胞でも PKA の活性化が認められると同時に、β-カゼインおよびリン酸化 STAT5 の発現量が減少するという結果が得られた。

これらの結果により、5-HT による β-カゼイン発現の抑制には、cAMP/PKA 経路の活性化が関与していることが示唆された。続いて、cAMP/PKA 経路の下流に位置する Protein kinase B (AKT) Extracellular signal-regulated kinase (ERK) の Jak2/STAT5 経路への関与を調べるために、AKT および ERK の阻害剤を用いて実験を進めたところ、これら因子の関与は認められなかった。そこで、cAMP を介して直接活性化される交換タンパク質として知られる Exchange protein directly activated by cAMP (EPAC) と、PKA を介した発現制御が確認されている脱リン酸化酵素の protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) の発現に着目し、cAMP/PKA 経路と Jak2/STAT5 経路との間の関連性についてさらに解析を進めた。その結果、30 μM 5-HT で単独処理した細胞における PTP1B の発現量は未処理の細胞に比べて大きく誘導され (図 1) 5-HT 単独処理による β-カゼインおよびリン酸化 STAT5 の発現量の減少は、5-HT および PTP1B 阻害剤 (sc-222227) の併用処理により有意に阻害された (図 2)。以上の結果から、5-HT は、5-HT<sub>7</sub> 受容体を介して cAMP/PKA 経路と PTP1B を活性化し、これらのことが STAT5 の脱リン酸化を介して β-カゼイン発現を抑制していると考えられた。

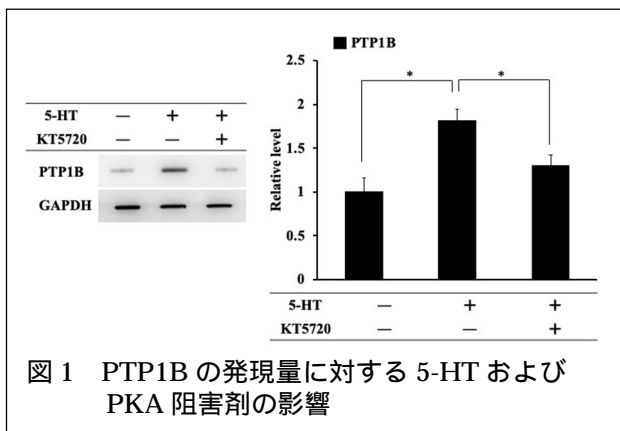


図 1 PTP1B の発現量に対する 5-HT および PKA 阻害剤の影響

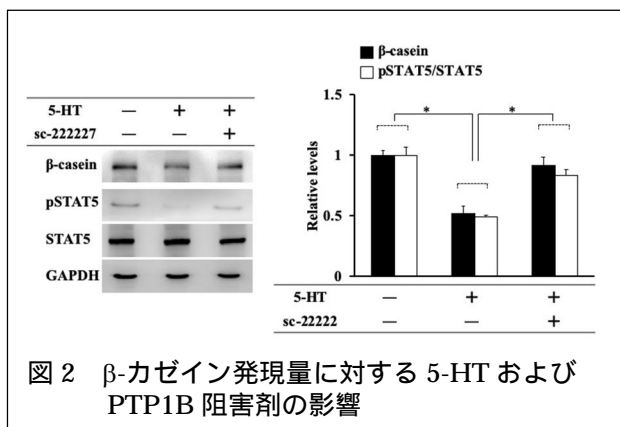


図 2 β-カゼイン発現量に対する 5-HT および PTP1B 阻害剤の影響

#### (2) 母乳中 5-HT の抽出・分析方法の評価

母乳からの 5-HT の回収率および変動係数について評価を行ったところ、回収率は 96.1~101.0%、変動係数は 3.39~8.62% であった。これらの結果から、固相抽出カラム (Supel-Select SCX SPE カラム) を用いた母乳中 5-HT の抽出方法は、高い再現性を有し、母乳中の 5-HT を効率よく抽出できる方法であることが示唆された。また、HPLC 分析における 5-HT および内部標準物質 (プロカイン塩酸塩) の保持時間は、それぞれ 22.5 および 32.3 min であり、妨害ピークの影響を受けない両物質の検出が可能であることが分かった。

#### (3) 母乳中 5-HT の生理的変動に関する評価

岩手医科大学附属病院で出産した健康授乳婦を対象に、母乳中の 5-HT 濃度が授乳前後で変化

するのか、さらには、約1年の授乳期間にわたってどのように変動するのかを調べた。

授乳前後における母乳中の5-HT濃度の変動に関する検討では、11名の健康授乳婦を対象とした。母乳の採取は、出産後約3ヶ月目にあたる任意日に、授乳直前、授乳1~2時間後、次回授乳直前の連続3回行った。解析の結果、授乳前後における母乳中5-HT濃度に、大きな変動は認められなかった。また、授乳期間における母乳中5-HT濃度の変動に関する検討では、5名の健康授乳婦を対象とした。母乳の採取は、出産5~6日後(初乳)1ヶ月後、3ヶ月後、6ヶ月後、離乳後、の計5回行った。解析の結果、5名の授乳婦全てにおいて、初乳の5-HT濃度が最も高く、授乳期間が進むにつれて、その濃度は減少することが明らかとなった。

#### 参考文献

- Matsuda M., Imaoka T., Vomachka A.J., et al. Serotonin regulates mammary gland development via an autocrine-paracrine loop. *Dev. Cell.* Vol. 6, No. 2, 2004, 193-203.
- Stull M.A., Pai V., Vomachka A.J., et al. Mammary gland homeostasis employs serotonergic regulation of epithelial tight junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Vol. 104, No. 42, 2007, 16708-13.
- Chiba T., Kimura S., Takahashi K., et al. Serotonin suppresses  $\beta$ -casein expression via inhibition of the signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) protein phosphorylation in human mammary epithelial cells MCF-12A. *Biol. Pharm. Bull.*, Vol. 37, No. 8, 2014, 1336-40.
- Chiba T., Kimura S., Takahashi K., et al. Serotonin regulates  $\beta$ -casein expression via 5-HT7 receptors in human mammary epithelial MCF-12A cells. *Biol. Pharm. Bull.* Vol 38, No. 3, 2015, 448-453.

#### 5. 主な発表論文等

##### 〔雑誌論文〕(計5件)

千葉健史、前田智司、工藤賢三、セロトニンを介した母乳産生制御メカニズム、薬学雑誌、査読有、Vol. 138、No. 6、2018、829-836

DOI : <https://doi.org/10.1248/yakushi.18-00003>

千葉健史、前田智司、平船寛彦、工藤賢三、妊婦・授乳婦における医薬品の安全性に関する情報の現状調査、医薬品情報学、査読有、Vol. 19、No. 4、2018、195-204

DOI : <https://doi.org/10.11256/jjdi.19.195>

前田智司、千葉健史、インタビューフォームに記載されている種々パラメータを用いた薬物の母乳移行性予測、薬局薬学、査読有、Vol. 9、No. 2、2017、184-191

[https://secure.ps-japan.org/pdf/journal\\_vol9\\_no2.pdf](https://secure.ps-japan.org/pdf/journal_vol9_no2.pdf)

Chiba T., Maeda T., Tairabune T., Tomita T., Sanbe A., Takeda T., Kikuchi A., Kudo K. Analysis of serotonin concentrations in human milk by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 485, No. 1, 査読有, 2017, 102-6.

DOI : 10.1016/j.bbrc.2017.02.027

Chiba T., Maeda T., Sanbe A., Kudo K. Serotonin suppresses  $\beta$ -casein expression via PTP1B activation in human mammary epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 473, No. 1, 査読有, 2016, 323-328.

DOI : 10.1016/j.bbrc.2016.03.103

##### 〔学会発表〕(計5件)

石黒絵里香、齋藤祐真、千葉健史、平船寛彦、前田智司、工藤賢三、授乳中のストレスは母乳中ノルアドレナリンを増加させる、日本薬学会第138年会、千葉市、2019年

上戸千尋、千葉健史、前田智司、藤田融、武田リカ、菊池昭彦、工藤賢三、乳腺上皮細胞にはノルアドレナリンを母乳中へ分泌し、それを取り込む機構が存在する、日本生化学会東北支部第84回例会、紫波郡、2018年

勝治みなみ、千葉健史、前田智司、武田リカ、菊池昭彦、工藤賢三、乳腺上皮細胞にはノルアドレナリンのオートクライン機構が存在する、日本薬学会第137年会、金沢市、2018年  
米内和暉、千葉健史、前田智司、工藤賢三、乳腺上皮細胞はカテコールアミンを合成し、母乳中へ分泌しているか?、第56回日本薬学会東北支部大会、青森市、2017年

平船寛彦、千葉健史、前田智司、富田隆、三部篤、武田リカ、菊池昭彦、工藤賢三、蛍光検出器を用いたHPLCによるヒト母乳中セロトニンの分析、日本薬学会第136年会、仙台、2017年

佐藤栄竜、千葉健史、前田智司、三部篤、工藤賢三、セロトニンはPTP1Bの活性化を介して-カゼイン発現を抑制する、第55回日本薬学会東北支部大会、郡山市、2016年

##### 〔図書〕(計0件)

##### 〔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：

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：前田 智司  
ローマ字氏名：( MAEDA, tomoji )  
研究協力者氏名：工藤 賢三  
ローマ字氏名：( KUDO, kenzo )  
研究協力者氏名：三部 篤  
ローマ字氏名：( SANBE, atsushi )  
研究協力者氏名：菊池 昭彦  
ローマ字氏名：( KIKUCHI, akihiko )  
研究協力者氏名：武田 リカ  
ローマ字氏名：( TAKEDA, rika )  
研究協力者氏名：平船 寛彦  
ローマ字氏名：( TAIRABUNE, tomohiko )

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。