

令和 2 年 6 月 20 日現在

機関番号：32425

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08460

研究課題名(和文) 母乳中に含まれる種々生理活性物質の生理的役割の解明

研究課題名(英文) Evaluation of physiological roles of various physiologically active substances in breast milk

研究代表者

前田 智司 (MAEDA, TOMOJI)

日本薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：60303294

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：母乳中のセロトニン(5-HT)およびノルアドレナリン(NA)の母乳産生および乳児に対する役割の解明を行った。母乳中の5-HTの経時的変動についての検討では、初乳、出産後1ヵ月、3ヵ月では母乳中の5-HTの含有量にほぼ同程度であった。母乳産生を担う乳腺上皮細胞は、NAを自ら合成し、母乳中へ分泌していることを明らかにした。さらに、授乳期にストレスを受けたマウスでは、母乳のNAが上昇し、 κ -カゼインを減少させることが分かった。これらの結果から母乳中に含まれている生理活性物質は母乳産生および乳児の成長に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

母乳中の生理活性物質の役割について検討を行った。母乳中の生理活性物質を測定し、乳児がどれだけの量の生理活性物質を服用しているかを明らかにした。したがって、今後、母乳中の生理活性物質の乳児に対する役割を見出すことができれば、母乳による育児の有益性や重要性について新たな意義が付加されと考えられる。さらに、ストレスにより母乳主成分の1つである κ -カゼインが減少することを明らかにした。授乳期の母乳産生がどのような分子メカニズムで制御されているのかは解明されておらず、母乳中の生理活性物質の役割が明らかとなれば、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の開発に貢献することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the roles of Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) and noradrenaline (NA) in breast milk on milk production and infants. 5-HT plays an important role in milk volume homeostasis in the mammary gland during lactation; 5-HT in milk may also affect infant development. The objective of this study was to investigate changes in 5-HT concentration in breast milk according to duration of lactation. As a result, the content of 5-HT in colostrum, 1 month and 3 months after delivery was almost the same amount. It was clarified that the mammary gland epithelial cells responsible for milk production synthesize NA and secrete it into breast milk. Furthermore, it was found that in mice that were stressed during lactation, NA in breast milk was increased and κ -casein was decreased. These results suggest that physiologically active substances contained in breast milk may be involved in breast milk production and infant growth.

研究分野：分子薬理学

キーワード：母乳 セロトニン ノルアドレナリン 生理活性物質 乳児

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 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。また、近年、母乳中の脂質が、乳幼児の脂肪燃焼機能の発達を促進し、成人期における肥満のリスクを軽減させることも明らかにされており (Ehara et al. *Diabetes* 64:775-784, 2014)、乳幼児に対する母乳の重要性に関する認識がさらに高まっている。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す、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。生理活性物質の一つであるセロトニン (5-HT; Hydroxytryptamine) は、多くの組織で合成され、生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、その 5-HT を母乳中へ分泌していることが分かっており、母乳中 5-HT は母乳産生制御に関与していることが報告されている (Matsuda et al. *Dev Cell* 7:133-144, 2004)。これまで申請者のグループは、母乳中 5-HT による母乳産生制御メカニズムを解明することを目的に、種々研究を展開し、一定の成果を挙げてきた。具体的には、5-HT がプロラクチン (PRL) を介した Januskinase2/signal transducer and activator transcription 5 pathway (PRL/Jak2/STAT5 系) における STAT5 のリン酸化を阻害し、母乳タンパク質の一つで、母乳産生機能の指標とされる κ -カゼインの発現を抑制すること、この抑制には乳腺上皮細胞に発現する 5-HT₇ 受容体が関与していることを明らかにした。さらには、5-HT₇ 受容体を介した STAT5 のリン酸化の阻害には、5-HT₇ 受容体の下流に位置するプロテインキナーゼ A (PKA) と、Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) の活性化が関与していることを明らかにした (Chiba et al. *Biol Pharm Bull* 37:1336-1340, 2014. Chiba et al. *Biol Pharm Bull* 38:448-453, 2015. Chiba et al. *Biochem Biophys Res Commun* 248:140-146, 2016)。しかしながら、母乳中 5-HT の乳幼児に対する役割に関しては全く分かっていない。乳幼児における脳内の 5-HT は、乳幼児突然死症候群 (Sudden Infant Death Syndrome: SIDS) の発症に深く関与していると考えられている。先進国における乳幼児死亡原因の第 1 位である SIDS の発症率は、生後 2~4 ヶ月目で最も高く、この時期の脳内 5-HT 濃度は著しく低下していることが報告されている。さらに、母乳で育てられた乳幼児は、人工乳で育てられた乳幼児よりも SIDS の発症リスクが低いことが報告されているが、そのメカニズムは分かっていない。加えて、成人における末梢組織で合成された 5-HT は脳内へ移行することはできないが、乳幼児の血液脳関門は、成人に比べて未発達であることから、5-HT が脳へ移行し、脳組織の発達等に関与している可能性も考えられる。

加えて、母乳中には、5-HT に加えて、ドパミン (DA; Dopamine)、ノルアドレナリン (NA; Noradrenaline) およびアセチルコリン (ACh; Acetylcholine) などの生理活性物質が存在していることが分かっている。これら 3 つの物質も、5-HT と同様に、母乳産生や乳児に対して何らかの影響を与えている可能性が高いと考えられるが、詳細は不明である。

2. 研究の目的

母乳は人工乳に比べて栄養学的に優れ、乳幼児の発達に大きな利益をもたらすことが分かっている。一方、母乳中には、セロトニン (5-HT)、ドパミン (DA)、ノルアドレナリン (NA)、アセチルコリン (ACh) 等の生理活性物質が含まれていることが分かっている。これまでに、5-HT に関しては、母乳産生制御に関与していることが分かっているが、他の生理活性物質の役割に

関しては全く分かっていない。さらに、様々な母乳成分が乳児に対して多くの利益を与えている事実を鑑みると、5-HTを含めたこれら生理活性物質も何らかの利益を乳児にもたらしている可能性は高いと考えられる。本研究では、母乳に含まれる生理活性物質として、5-HT、DA、NA、AChに着目し、これら物質の生理的役割について解明を行う。

3. 研究の方法

(1) 母乳中5-HTの乳児に対する役割の解明

マウス母乳中5-HTの測定

出産直後のマウスを用い、出産直後から21日目(離乳)までの期間の母乳をマウス専用の搾乳器を用いて回収し、セロトニン(5-HT)および5-HTの代謝物の測定を行う。5-HTの測定には高速液体クロマトグラフィーに電気化学検出器(ECD検出器)を組み合わせたHPLC-ECDを用いる。HPLC-ECDを用いた母乳中の5-HTの測定法はすでに確立済みである。

乳児マウスにおける脳内・腸管の5-HT濃度測定および5-HTトランスポーター発現量の解析
生後直後から21日目(離乳時)の新生児マウスを用い、脳および腸管に含まれる5-HT濃度の測定を行う。具体的には、生後1日目、5日目、10日目、15日目、21日目のマウスの脳および腸管を摘出し、各臓器に含まれる5-HT量をHPLC-ECDで測定する。また、脳内での5-HT量の調節に関与していると考えられている5-HTトランスポーターの発現量の経時的変化をウエスタンブロット法により調べ、乳幼児突然死症候群(Sudden Infant Death Syndrome: SIDS)との関連について検討を行う。

次に、新生児マウスをコントロール群(母乳を与えられたマウス)、5-HTを含有するマウス用人工乳群、5-HTを含有しないマウス用人工乳群の3群に分類し、生後1日目、5日目、10日目、15日目、21日目のマウスの脳および腸管を摘出し、それぞれの臓器に含まれる5-HT量をHPLC-ECDで測定する。マウス用人工乳は、宿田の方法(*Exp. Anim.* 27, 271-281, 1978)に従って調製し、投与方法は、鈴木らの方法(口病誌. 53, 631-637, 1986)に従って、胃カテーテルによる強制経口投与とする。また、5-HTの経口投与量は、1-1)における母乳中5-HT濃度の評価で得られた結果をもとに決定する。

最初の検討では脳および腸管の回収は5日間置きに設定しているが、研究結果に応じて回収間隔は変更していく予定である。

母乳中5-HTの乳児に対する役割の解明

新生児マウスを用い、コントロール群(母乳)、5-HTを含有するマウス用人工乳、5-HTを含有しないマウス用人工乳で21日間飼育した3群について、学習・行動記憶解析を行う。具体的な検討項目および評価方法は、健康状態(体重、食事量) サーカディアンリズム 空間学習(8方向放射状迷路試験) 社会性(Three chambers Social interaction test)を行う。サーカディアンリズムについては、サーカディアンリズムをもっているコルチゾール(唾液から回収)の測定を行う。母乳および新生児マウスの唾液の回収が困難な場合は、マウスからラットに動物種を変更して研究を遂行する。

(2) 母乳中5-HT、DA、NA、AChの濃度測定

ヒト母乳中の5-HT、DA、NA、AChの測定

ヒト母乳中の5-HT、DA、NA、ACh濃度に関する報告はほとんどないのが現状である。この検討では、ヒト母乳中に存在するこれら生理活性物質濃度を測定し、これら物質がどのぐらいの濃度でヒト母乳中に存在しているのか、さらには、乳児がどのぐらいの量を服用することになるのかを評価する。

具体的には、岩手医科大学附属病院産婦人病棟で出産した健康授乳婦を対象に、同意が得られた授乳婦から母乳を1回採取し、これら生理活性物質濃度を測定する。目標症例数は10例とする。母乳の採取量は約3 mLとし、採取した母乳は、直ちに-80℃の冷凍庫に保管する。一定期間後、測定解析のため定量は、蛍光検出器を用いた高速液体クロマトグラフィー法で行う(母乳の前処理方法、並びに蛍光検出器による5-HTの定量方法は、既に確立している)。

なお、本検討は、平成30年度の検討開始へ向けて、平成29年度4月に岩手医科大学倫理審査委員会および日本薬科大学倫理委員会へ実施計画書を提出する予定である。

マウス母乳中のDA、NA、およびAChの測定

1- で示した方法と同様の方法を用いる。

(3) 母乳産生に対するDA、NA、およびAChの役割の解明

乳腺における母乳産生制御に着目した研究報告は、世界的に見ても非常に少ない。先行研究としては、シンシナティー大学の研究グループと申請者の研究グループが、母乳産生制御における5-HTの関与について研究を展開している。5-HTと同様に、DA、NAおよびACh等の生理活性物質が、母乳産生に対して何らかの影響を与えている可能性が考えられるが、この点に関しては全く不明である。

そこで、本研究では、申請者のグループが5-HTの母乳産生に対する影響を評価するために構築した、正常ヒト乳腺上皮細胞株MCF-12Aを利用した細胞培養系を用い、DA、NA、およびAChの母乳産生に対する影響を評価する。

具体的には、母乳タンパクの一つで、母乳産生機能の指標とされる α -カゼインの発現に着目し、DA、NA、およびAChの α -カゼイン発現に与える影響を評価する。さらに、影響を与える物質に対して、シグナルカスケードを含めた詳細な解析を行う。

(4) 母乳中ドパミン、ノルアドレナリン、アセチルコリンの乳幼児に対する役割の解明

1- で示した方法と同様の方法を用いる。

4. 研究成果

(1) 母乳中5-HTの乳幼児に対する役割の解明

母乳中のセロトニン(5-HT)の母乳産生および乳児に対する役割の解明を目的に、母乳中の5-HTの経時的変動について検討を行った。岩手医科大学附属病院産婦人病棟で出産した健康授乳婦を対象に、同意が得られた授乳婦から母乳の採取を行った。採取した母乳は、直ちに-80℃の冷凍庫に保管した。その結果、初乳で母乳中の5-HTの含有量が高く、出産後1ヵ月、3ヵ月、6ヵ月と5-HTの含有量の減少傾向が観察された。この結果から、出産直後の乳児では、十分量の5-HTが産生されず、母乳中の5-HTが不足分を補っている可能性が示唆された。また、5-HTが母乳産生の抑制因子という報告が他のグループからされていたが、少なくとも、授乳直後と授乳直前で5-HT量に変化が観察されなかったことより、短期的な母乳産生抑制因子としては機能していない可能性が示唆された。これらの結果を論文としてまとめ投稿中である。

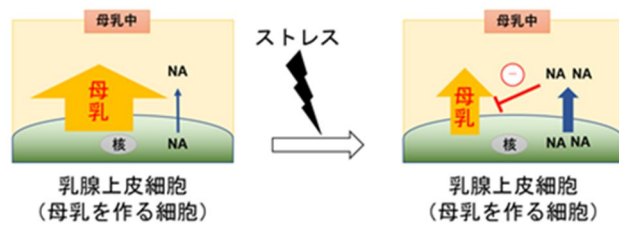
ラット母乳をマウス・ラット専用の搾乳器を用いて回収し、5-HTおよびNAの回収方法および精製方法の確立を行った。今後は、出産から離乳までの母乳を回収・精製し5-HTやNA量の測定を行い、母乳産生および乳児に対する役割の解明を行う。また、生後直後および21日目(離乳時)の新生児ラットを用い、脳および腸管に含まれる5-HT濃度の測定中である。さらに、脳内での5-HT量の調節に関与していると考えられている5-HTトランスポーターの発現量の経時的变化をウエスタンブロット法により調べ、乳幼児突然死症候群(Sudden Infant Death Syndrome: SIDS)との関連について検討を行っている。

(2) 母乳中のノルアドレナリン(NA)、ヒスタミン(His)、メラトニン(ME)の濃度測定

ヒト母乳中のノルアドレナリン(NA)、ヒスタミン(His)、メラトニン(ME)濃度に関する報告はほとんどないのが現状である。そこで、ヒト母乳中に存在するこれら生理活性物質濃度を測定し、これら物質がどのくらいの濃度でヒト母乳中に存在しているのか、さらには、乳児がどのくらいの量を服用することになるのかを評価を行うために、NA, His, ME の精製方法および測定方法を確立した。

母乳産生に対する NA の役割についての検討を行った。その結果、母乳産生を担う乳腺上皮細胞は、NA を自ら合成し、母乳中へ分泌していることを見出した。さらに、母乳中に分泌した NE の取り込み機構として、乳腺上皮細胞のアピカル側にノルアドレナリントランスポーターが発現し、ノルアドレナリントランスポーターの K_m は $5 \mu\text{M}$, V_{max} は $2.6 \text{ fmol}/\mu\text{g protein}/\text{min}$ と算出された。これらの結果を論文にまとめ投稿中である。

授乳期にストレスを受けたマウスでは、母乳の NA が上昇し、乳幼児の成長に関わるタンパク質で、その濃度は母乳量の指標である α -カゼインを減少させた。また、乳腺上皮細胞において、NA は α -カゼインの分泌を抑制し、これにはアドレナリン β_2 受容体が関与することを明らかにした。これらの結果は論文としてまとめた。



LC/MS/MS を用いたヒト母乳中のノルアドレナリンの測定法を確立の検討中である。母乳中から固相カラムを用いて抽出し、LS/MS/MS の条件を検討し、現在検量線の作成中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 千葉健史, 前田智司, 工藤賢三	4. 巻 138
2. 論文標題 セロトニンを介した母乳産生制御メカニズム	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 薬学雑誌	6. 最初と最後の頁 829-836
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.18-00003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 千葉 健史、前田 智司、平船 寛彦、工藤 賢三	4. 巻 19
2. 論文標題 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	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 医薬品情報学	6. 最初と最後の頁 195 ~ 204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11256/jjdi.19.195	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 前田 智司、千葉 健史	4. 巻 9 (2)
2. 論文標題 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	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 薬局薬学	6. 最初と最後の頁 184-191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Chiba Takeshi, Maeda Tomoji, Fujita Yu, Takeda Rika, Kikuchi Akihiko, Kudo Kenzo	4. 巻 160
2. 論文標題 Stress-Induced Suppression of Milk Protein Is Involved in a Noradrenergic Mechanism in the Mammary Gland	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 2074 ~ 2084
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/en.2019-00300	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石黒絵理香, 齋藤祐真, 千葉健史, 平船寛彦, 前田智司, 工藤賢三
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第138回日本薬学会年会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 勝治みなみ, 千葉健史, 前田智司, 藤田融, 武田リカ, 菊池昭彦, 工藤賢三
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第137回日本薬学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	千葉 健史 (Chiba Takeshi) (80552926)	北海道科学大学・薬学部・講師 (30108)	
研究分担者	浦丸 直人 (Uramaru Naoto) (90424069)	日本薬科大学・薬学部・講師 (32425)	