

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：30108

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07227

研究課題名(和文) 母乳中ノルアドレナリンに着目したストレスによる母乳産生の抑制機序と乳児への役割

研究課題名(英文) Stress-induced suppression of milk production, and the influence of noradrenaline in human milk on infant development

研究代表者

千葉 健史 (Chiba, Takeshi)

北海道科学大学・薬学部・講師

研究者番号：80552926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、乳腺上皮細胞がノルエピネフリン(NE)を合成し、母乳中に分泌していることを明らかにした。また、授乳期のストレスは、乳腺上皮におけるチロシン水酸化酵素の発現を誘導し、母乳中NE濃度を上昇させることも明らかにした。さらに、授乳期のストレスは、母乳中 α -カゼイン濃度を減少させる可能性があり、この減少には、ストレスによって上昇した母乳中NEのアドレナリン α_2 受容体を介した作用が関与している可能性があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

授乳期のストレスは母乳量だけでなく、いくつかの母乳成分の含量を変化させることが分かっている。9割以上の母親が母乳育児を望んでいる一方で(平成27年度厚生労働省乳幼児栄養調査より)、ストレスにより乳児に必須な母乳成分に悪影響をもたらされることになれば、適切な母乳育児の遂行が妨げられ、母子双方に対して不利益をもたらされる。これまで、ストレスと母乳成分の変化を関連づける因子は明らかにされていなかったが、本研究によって、その因子の一つに、乳腺上皮由来のノルエピネフリンがあることを明らかにすることができた。本研究成果は、授乳婦に適したストレス回避手段の開発に貢献することが期待できると考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that mammary epithelial cells synthesize norepinephrine (NE) and secrete it into milk. Additionally, we found that stress exposure during lactation induces tyrosine hydroxylase expression in mammary epithelium and increases NE concentration in milk. Furthermore, our study shows that stress exposure during lactation may decrease α -casein concentration in milk and this reduction may be related with actions through adrenergic α_2 receptors expressing on mammary epithelial cells.

研究分野：医療薬学、健康科学

キーワード：母乳 ノルエピネフリン 乳腺上皮細胞 ストレス 母乳タンパク質 α -カゼイン

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、乳児の様々な器官の発達を促す。また、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。

乳腺上皮で産生された内因性セロトニン (5-HT) は、母乳産生制御という重要な役割を果たしている¹。これまで我々は、非腫瘍性ヒト乳腺上皮細胞 MCF-12A を用いて、5-HT 処理が、Jak2/STAT5 系における STAT5 のリン酸化の阻害を介して、母乳タンパク質の一つである α -カゼイン発現を抑制することを報告してきた²。また、この抑制には、MCF-12A における 5-HT7 受容体を介した脱リン酸化酵素 protein tyrosine phosphatase 1B の活性化が関与していることも報告した³。

一方、セロトニンと似た化学構造を有し、生理活性モノアミンの一つとして知られているノルエピネフリン (NE) は、脳、副腎、卵巣、交感神経等で産生され、神経伝達物質として重要な役割を果たしている。これまでに、ウシ母乳中に NE が存在することは報告されていたが、ヒト母乳中における NE の存在は明らかにされていない。

乳児の感染症予防に寄与している母乳中の分泌型 IgA は、不安、落胆、恐怖、怒りといった感情が強い授乳婦ほど、その母乳中濃度は低くなることが報告されている⁴。また、ウシやマウスを用いた動物研究においても、暑熱ストレスや精神的ストレスを受けた母畜の母乳量、母乳中のカゼイン、脂質およびアミノ酸等の含有量は、非ストレス下の動物に比べて、大きく低下することも報告されている⁵。これらの結果は、授乳期に母親が受ける心理的・精神的ストレスは、母乳量や、いくつかの母乳成分の含有量に大きな変化をもたらすことを意味している。しかしながら、授乳婦が受けるストレスが、どのような因子を介して、母乳量あるいは母乳成分に影響を与えているのかは分かっていない。

2. 研究の目的

本研究では、ストレスによる母乳成分の変化に、母乳中 NE が関与している可能性があるとの仮説を立て、ストレスと母乳中 NE 濃度との関連性を調べるとともに、母乳タンパク質の一つである α -カゼインに対する NE の影響を評価することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 健康授乳婦からの母乳採取

岩手医科大学附属病院で出産した健康授乳婦のうち、本研究への参加同意が得られた授乳婦を被験者とした。各被験者から 5~10 mL の母乳が採取され、採取された母乳は、すぐに少量ずつに小分けされ、分析するまで -80 °C で保存された。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。

(2) 母乳中および細胞培養液中の NE 濃度の測定

母乳および細胞培養液からの NE の抽出には、固相抽出カラムの一つである Monospin PBA column (GL サイエンス社) を用いた。また、NE 濃度の測定には、電気化学的検出器を附属した高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた。移動相には、1 mM の 1-オクタンスルホン酸ナトリウムを含有する 20 mM リン酸緩衝液 (pH 2.5) とメタノール混液 (85:15) を用いた。さらに、分析カラムには COSMOSIL PBr column (4.6 mm, 150 × 4.6 nm, ナカライテスク社) を、内部標準物質にはパラオキシ安息香酸メチルを用いた。

(3) 細胞培養

本研究では、二つの非腫瘍性ヒト乳腺上皮細胞株 MCF-10A・MCF-12A と、正常ヒト乳腺上皮細胞 HMEC を用いた。MCF-10A および MCF-12A は、 1×10^5 cells/cm² の密度でディッシュに播種し、培養液には、10 μ g/mL ヒトインスリン、0.5 μ g/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 ペニシリンおよび 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 を用いた。HMEC は、2,500 cells/cm² の密度でディッシュに播種し、培養液には MEGM™ BulletKit™ (Lonza 社) を用いた。

各細胞を 90% 以上のコンフルエントになるまで培養した後、NE (0.01、0.1、1 μ M) あるいはサルブタモール (1、10 μ M) を添加し、48~72 時間インキュベートした。

(4) MCF-12A に対する TH siRNA の導入

MCF-12A を 1×10^5 cells/cm² の密度でディッシュに播種した。24 時間後、40 μ M の TH siRNA (QIAGEN) を添加し、72 時間インキュベートした。

(5) 動物実験

妊娠 14~15 日目の CD1 マウスを購入し、出産後 7 日間、ゲージ内で通常飼育を行った。母マウスへの拘束ストレス負荷は、授乳期 8 日目~10 日目までの 3 日間行い、空気孔を空けた遠沈管に 1 日 30 分間静置することによって実施した。ストレス負荷後、Animal Lancets (MEDIPoint) を用いて全血試料を採取し、採取後すぐに遠心分離して、血漿試料を得た。母乳および乳腺組織は、授乳期 10 日目のストレス負荷後に採取した。母乳採取には乳房ポンプ (KN-591、夏目製作所) を用いた。また、母乳採取後すぐに、乳腺組織を採取し、液体窒素で凍結保存した。母乳と血漿サンプルは、解析まで -80 °C で保存した。

(6) ウェスタンブロッティング

培養細胞あるいは乳腺組織からのタンパク質の抽出には、M-PER mammalian protein extraction reagent、あるいは T-PER mammalian protein extraction reagent (いずれも Thermo Fisher Scientific) をそれぞれ用いた。また、タンパク質抽出液と濃縮サンプルバッファー溶液を用いて、ウェスタンブロット用の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 (cytiva) を用い、LAS-3000 (富士フイルム) を用いて検出した。

(7) ELISA キットを用いた種々試料測定

マウス乳汁中 -カゼイン濃度の測定には、Mouse CSN2/Beta Casein ELISA Kit (LSBio) を用いた。また、マウス血漿中コルチゾール濃度の測定には、Cortisol (human/mouse/rat) ELISA Kit (BioVision) を用いた。

4. 研究成果

(1) ヒト母乳中の NE 濃度測定

今回用いた固相抽出方法における母乳からの NE 回収率は、95% 以上であった。HPLC による定量分析における NE の定量限界 (ratio of signal to noise (S/N)=5) は、1 ng/ml (約 0.5 nM) であった。一方、本研究への参加同意が得られた授乳婦は 8 名であった。これらの授乳婦の内、出産経験が 2 回以上ある女性は 5 名、初産の女性が 3 名であった。また、母乳採取時の授乳期間は、6 日目が 4 名、180 日目が 1 名、270 日目が 1 名、213 日目が 1 名、720 日目が 1 名であった。これらの授乳婦から得られた母乳を用いて NE 濃度を調べたところ、ヒト母乳中の NE 濃度は、おおよそ 12.7~115.5 nM の範囲にあることが分かった。

(2) ヒト乳腺上皮細胞におけるチロシン水酸化酵素の発現

ヒト乳腺上皮細胞に NE の合成律速酵素であるチロシン水酸化酵素 (TH) が発現しているかどうかを調べるために、ウェスタンブロット法を用いて、HMEC、MCF-10A、MCF-12A における TH 発現を評価した。その結果、3 つ全ての細胞に、TH が発現していることが確認された。

(3) MCF-12A に対する TH siRNA 導入が、培養液中の NE 濃度に与える影響

TH siRNA を導入した MCF-12A における TH 発現量は、コントロール siRNA を導入した細胞に比べて有意に低下した。また、TH siRNA を導入した MCF-12A の培養液中の NE 濃度は、コントロール siRNA を導入した細胞に比べて有意に低下した (表 1)。

ここまでの研究成果から、ヒト乳腺上皮細胞には NE を合成し、母乳中へ分泌する生理機能が存在していることが明らかとなった。

表 1 TH siRNA を導入した MCF-12A の培養液中の NE 濃度

	NE 濃度
Control siRNA を導入	3.05 ± 0.33 nM
TH siRNA を導入	1.15 ± 0.09 nM

(4) マウス母乳中の NE 濃度および -カゼイン濃度に対する拘束ストレス負荷の影響

ストレス負荷マウスにおける母乳中 NE 濃度および乳腺組織における TH 発現量は、非ストレス負荷マウスに比べて、有意に高かった (図 1A、図 1B)。さらに、ストレス負荷マウスにおける母乳中 -カゼイン濃度は、非ストレス負荷マウスに比べて、有意に低かった (図 1C)。なお、ストレス負荷マウスにおける血漿中コルチゾール濃度は、ストレス負荷を行った 3 日間にわたって、非ストレス負荷マウスに比べて有意に高かった (図 1D)。

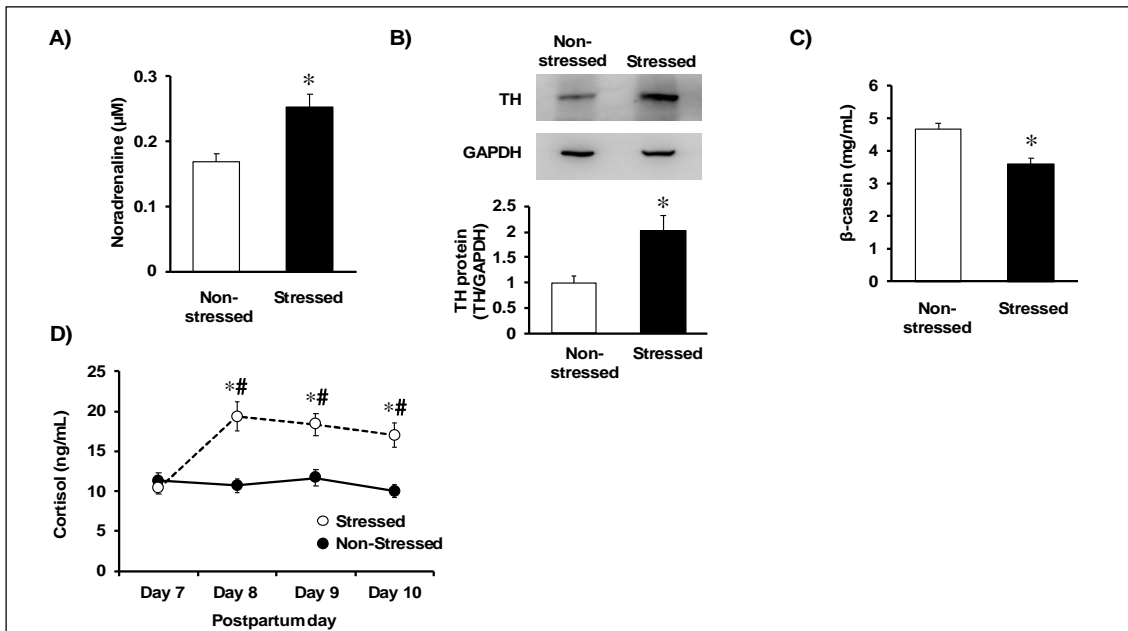


図1 マウス母乳中のNE濃度およびβ-カゼイン濃度に対する拘束ストレスの影響

(5) MCF-12Aのβ-カゼイン発現に対するサルブタモール処理の影響

MCF-12Aを2刺激薬であるサルブタモール(1、10 µM)で処理したところ、そのβ-カゼイン発現量は、サルブタモール濃度依存的に減少することが明らかとなった(図2)。

これらの結果から、授乳期のストレスは、母乳中NE濃度を上昇させる可能性があり、このNE濃度の上昇には、ストレスによる乳腺組織内のTH発現誘導が関与していることが示唆された。また、授乳期のストレスによって生じた母乳中β-カゼイン濃度を低下には、母乳中NEの2受容体を介した作用が関与している可能性があると考えられた。

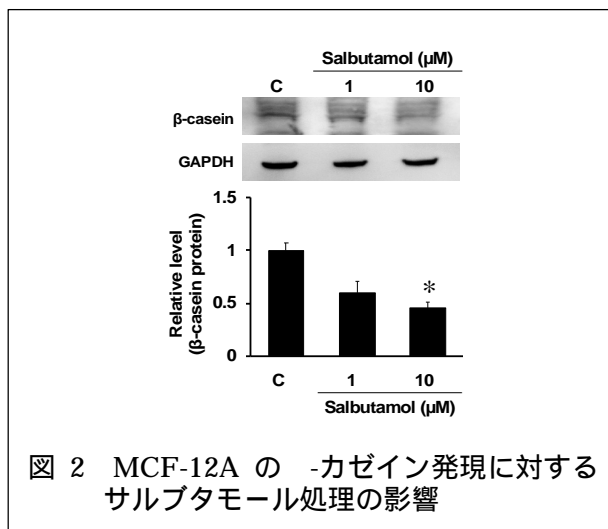


図2 MCF-12Aのβ-カゼイン発現に対するサルブタモール処理の影響

引用文献

- Marshall AM, Hernandez LL, Horseman ND. Serotonin and serotonin transport in the regulation of lactation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2014;19(1):139-146.
- Chiba T, Kimura S, Takahashi K, Morimoto Y, Sanbe A, Ueda H, Kudo K. Serotonin suppresses β-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*. 2014;37(8):1336-1340.
- Chiba T, Maeda T, Sanbe A, Kudo K. Serotonin suppresses β-casein expression via PTP1B activation in human mammary epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;473(1):323-328.
- Kawano A, Emori Y. The relationship between maternal postpartum psychological state and breast milk secretory immunoglobulin A level. *J Am Psychiatr Nurses Assoc*. 2015;21(1):23-30.
- Kassube KR, Kaufman JD, Pohler KG, McFadden JW, Rius AG. Jugular-infused methionine, lysine and branched-chain amino acids does not improve milk production in Holstein cows experiencing heat stress. *Animal*. 2017;11(12):2220-2228.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 2件）

1. 著者名 Maeda T., Shioyama A., Tairabune T., Takeda R., Sanbe A., Kikuchi A., Kudo K., Chiba T.	4. 巻 79-80
2. 論文標題 Physiologic changes in serotonin concentrations in breast milk during lactation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrition	6. 最初と最後の頁 110969
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.nut.2020.110969.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Chiba T., Takaguri A., Maeda T.	4. 巻 545
2. 論文標題 Norepinephrine transporter expressed on mammary epithelial cells incorporates norepinephrine in milk into the cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.01.015.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Chiba T, Maeda T, Fujita Y, Takeda R, Kikuchi A, Kudo K.	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 千葉健史、前田智司
2. 発表標題 乳腺上皮におけるノルエピネフリントランスポーターの発現と機能
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 千葉健史、前田智司
2. 発表標題 乳腺上皮細胞におけるノルエピネフリントランスポーターの発現と局在
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 千葉カナ、平船寛彦、高橋宏彰、朝賀純一、千葉健史、工藤賢三
2. 発表標題 HPLC-UV検出法を用いたヒト母乳中パロキサビルマルボキシルおよびその活性代謝物の定量法の検討
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 斎藤大輝、千葉健史
2. 発表標題 母乳中microRNA-148a発現量の授乳期内変動、並びに人工乳における発現量の評価
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 今井秀樹、片桐正孝、田邊由幸、芽野大介、千葉健史、千葉輝正、前田智司	4. 発行年 2020年
2. 出版社 東京化学同人	5. 総ページ数 256
3. 書名 くすりの基礎を知る（基本を学ぶ 看護シリーズ4）	

〔産業財産権〕

〔その他〕

北海道科学大学NEWS TOPICS
https://www.hus.ac.jp/hit_topics/2019/06/201906143377.html

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	前田 智司 (Maeda Tomoji) (60303294)	日本薬科大学・薬学部・教授 (32425)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------