

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月11日現在

機関番号：10105

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22880003

研究課題名（和文）

乳腺上皮細胞における電解質透過性およびその調節機構の解明

研究課題名（英文）

Investigation of the selective ion transport system of mammary epithelial cells

研究代表者

上川 昭博（KAMIKAWA AKIHIRO）

帯広畜産大学 畜産学部 助教

研究者番号：30581665

研究成果の概要（和文）：

乳汁分泌には乳腺分泌上皮細胞の選択的な電解質の輸送が重要であると考えられているが、どのようなイオンチャンネルが機能しているかは明らかになっていない。本研究では、泌乳期のマウスから単離した乳腺分泌上皮細胞に電気生理学的手法（ホールセルパッチクランプ法）を適用し、電解質透過性を解析した。その結果、乳腺分泌上皮細胞には内向き整流性 K^+ チャンネル（Kir）が機能的に発現していることが示された。乳汁分泌におけるKirの役割についても大変興味深く、さらなる研究の進展が期待される。

研究成果の概要（英文）：

It has been suggested that the selective ion transport of mammary epithelial cells play an important role in lactation. However, active ion channels in mammary secretory cells are unknown. To reveal the mechanisms of lactation, we investigated the active ion channels in mammary secretory cells. A whole-cell patch clamp technique was applied to mammary epithelial cells (MEC) freshly isolated from mammary glands of lactating mice. In this study, we found the functional expression of inwardly rectifying potassium (Kir) channels in lactating MEC.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2010 年度	1,140,000	342,000	1,482,000
2011 年度	1,090,000	327,000	1,417,000
年度			
年度			
年度			
総 計	2,230,000	669,000	2,899,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：乳腺 イオンチャンネル 上皮細胞 電気生理学 発達

1. 研究開始当初の背景

乳腺は哺乳動物に特徴的な外分泌腺であり、出産後の雌性動物でのみ生理機能が発揮され、乳汁（ミルク）を産生する。1970年代、Linzell と Peaker は血漿中、乳中、細胞質内の電解質濃度と経上皮電位の測定を元に、イオンチャンネル、トランスポー

ター、ポンプによる電解質輸送を介した乳汁分泌モデルを想定した（図1）。血管側膜、管腔側膜の計測された静止膜電位はそれぞれ -41mV 、 -44mV であり、 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- の細胞内外の濃度差から算出されるそれぞれの平衡電位を勘案すると、血管側膜では K^+ チャンネルが、管腔側膜では K^+ チャネ

ル、 Na^+ チャネルまたは非特異的な陽イオンチャネルが静止膜電位の形成に寄与していると考えられる。また、 Cl^- イオンは電気化学ポテンシャルに逆らって細胞内に蓄積しており、能動輸送の存在が示唆される。さらに、分泌刺激入力時には管腔側膜の Cl^- チャネルが開口して Cl^- が管腔内に分泌され（電気的中性を保ち分泌を持続させるために同時に K^+ チャネルの開口、 K^+ の分泌も想定される）、浸透圧勾配に依存して水の管腔側への移動が生じると仮説が立てられている。ところがLinzellらによる仮説の提唱から40年を経た現在においても、泌乳期の乳腺上皮細胞で機能的に発現するイオンチャネルは同定されていない。

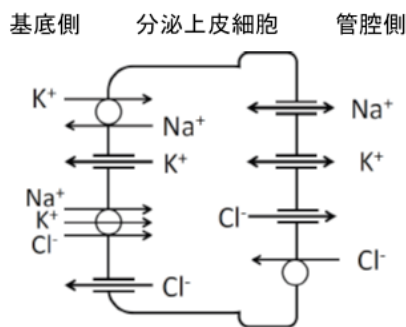


図1 想定される電解質輸送機構

2. 研究の目的

泌乳期の乳腺上皮細胞で機能的に発現するイオンチャネルと、妊娠から泌乳に至る発達過程でのそれらの発現調節機構を明らかにすることを研究の目的とした。本研究の成果は、乳汁分泌機構を解明する上で重要な基礎的知見となる。

3. 研究の方法

(1) 機能解析

泌乳期（泌乳10-18日目）のマウスから乳腺分泌上皮細胞を単離し、ホールセルパッチクランプ法を用いて、細胞膜の電解質透過性を解析した。細胞は単離後速やかに実験に供し、培養などによる性質変化の影響を排除し、分泌上皮細胞の電解質透過性をより直接的に評価した。

ホールセルパッチクランプ法は細胞内外の溶液組成と細胞の膜電位を人為的に制御し、その時に膜を通過するイオンを膜電流として検出する方法である。細胞内灌流液は145 mM K^+ などを含むHEPES緩衝液(pH 7.4)で、10 mM EGTAにより細胞内 Ca^{2+} をキレートした。細胞外液には5 mM K^+ と145 mM Na^+ などを含むHEPES緩衝液(pH 7.4)を用いた。細胞外 K^+ 濃度を増加させる実験

では、等モルの Na^+ と置き換えた。

(2) 分子発現解析

未妊娠のマウス、また泌乳15日目のマウスから乳腺組織を採取し、total RNAを抽出した。そのtotal RNAを用いて、Kirファミリー分子のmRNA発現量をRT-PCR法を用いて解析した。また、泌乳15日目のマウス乳腺を採取し、ホルマリン固定した後に薄切切片とした。Kir2.1およびKir4.2に対する抗体を用いて免疫染色を行い、これら分子のタンパク質発現と局在を解析した。

(3) 性ホルモンによるイオンチャネル分子、発現調節機構の解析

未妊娠マウス(n=4)の卵巣を切除した。手術から回復した後、2匹にはエストロゲン(1 $\mu\text{g}/\text{day}$)とプロゲステロン(1 mg/day)を含むコーンオイルを皮下に5日間投与し、残り2匹には対照として溶媒を5日間投与して、乳腺組織を採取した。右側腹部乳腺はホルマウントカーミン染色に供し、乳腺導管の形態変化の観察に用いた。左側腹部乳腺組織からtotal RNAを抽出し、上記と同様にKir mRNAの発現量を解析した。

4. 研究成果

(1) 乳腺分泌上皮細胞の電解質透過性解析

① まず、乳腺分泌上皮細胞を用いたホールセルパッチクランプ解析実験法を確立した。泌乳期のマウス乳腺をコラゲナーゼとヒアルロニダーゼを含む溶液で消化して、単離分泌上皮細胞(MEC)を採取した。図2に示した直径25 μm 程度の球形の細胞は、泌乳期の乳腺組織から採取される細胞の大部分を占めていたが、乳腺分泌上皮細胞が発達していない妊娠前の乳腺組織からは全く採取されなかった。よって、これらの細胞は乳腺分泌上皮である。

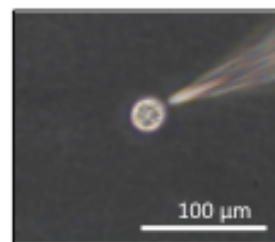


図2 単離した乳腺分泌上皮細胞（中央）とガラス電極（右）

上記細胞にガラス電極を密着させ、ガラス電極内に陰圧をかけて細胞膜を破壊し、細胞内溶液をガラス電極内溶液に置き換えた。細胞の膜電位を任意の値に固定し、その時に流れるホールセル電流を測定した。

② 泌乳期の乳腺上皮細胞 (MEC) に内向き整流性の (内向きには流れやすいが外向きには流れにくい) 膜電流が存在することを明らかにした。この内向き膜電流は細胞外 K^+ の増加により増強された (図 3)。

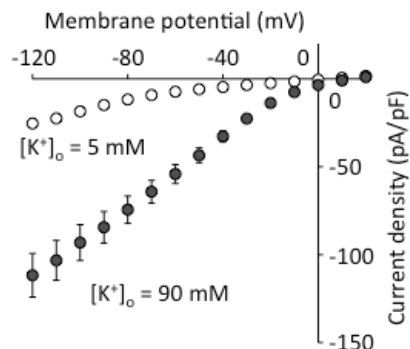


図 3 細胞外 K^+ 濃度 5 mM または 90 mM のときの MEC における膜電流

③ MEC における内向き整流性 K^+ (Kir) 電流は細胞外の Ba^{2+} (図 4), Cs^+ により可逆的に抑制された。

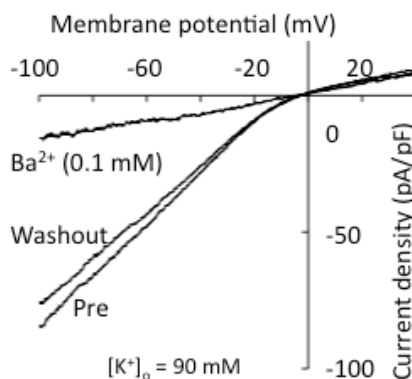


図 4 細胞外 Ba^{2+} による Kir 電流の可逆的な抑制

④ Kir チャネルファミリー分子の中で、Kir2.x と Kir4.x は MEC で検出された Kir のような強い (または中程度の) 整流性を示すことが知られている。その中で Kir2.3, Kir2.4, Kir4.1, Kir4.2 は細胞内または細胞外の pH の変化によりその K^+ 透過性が変化することが報告されている。ところが、MEC における Kir 電流は細胞内外の pH 変化による影響を受けなかった。

(2) Kir 分子の発現解析

① Kir チャネルファミリー分子の中で、強い整流性を示すことが知られている Kir2.x および中程度の整流性を示すことが知られている Kir4.x について、乳腺組織における mRNA 発現を解析した。Kir2.2,

Kir2.3, Kir2.4, Kir4.1 は未妊娠期 (分泌上皮は未発達)、泌乳期 (分泌上皮が発達) の乳腺組織ともに発現が認められなかった。Kir2.1 と Kir4.2 の mRNA は妊娠前の乳腺では検出されなかったが、泌乳期の乳腺では豊富に発現が認められた (図 5)。

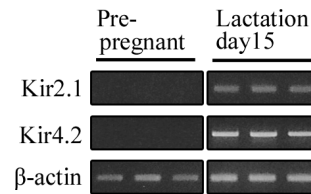


図 5 妊娠前および泌乳 15 日目の乳腺における Kir 遺伝子の発現

② Kir2.1 抗体を用いて免疫染色を行うと、泌乳期の乳腺分泌上皮細胞は強陽性を示した。一方、Kir4.2 抗体を用いた場合、わずかに陽性を示すのみであった。

(3) Kir2.1 発現調節機構の解析

卵巣切除した未妊娠マウスにエストロゲンとプロゲステロンを 5 日間投与 (EP 群, $n=2$) し、乳腺組織における Kir2.1 mRNA の発現量に及ぼす影響を解析した。卵巣切除をしたのち溶媒を投与したマウス (対照群, $n=2$) では、無処置の妊娠前のマウス乳腺と同様に Kir2.1 の発現は認められなかった。また、EP 群においても Kir2.1 の発現は認められなかった。

一方、乳腺組織にホールマウント染色を施して、乳腺形態の変化を観察したところ、EP 投与群では対照群に比して、乳腺導管側枝の出芽が増加しており、妊娠初期に見られる乳腺上皮組織の増殖性変化が確認できた。

以上のことから、妊娠初期の導管形態変化を引き起こすエストロゲンとプロゲステロンの作用は、Kir2.1 の発現誘導には十分ではないことが示唆された。

(4) まとめ

上述の電気生理学的、生化学的解析から、乳腺分泌上皮細胞には Kir チャネルが機能的に発現していること、また、Kir チャネルファミリー分子の中でも Kir2.1 の主要な関与が強く示唆された。

これまでに、泌乳期の乳腺上皮細胞で機能的に発現しているイオンチャネルは報告されていない。また、乳腺上皮培養細胞においても Kir チャネルの発現は報告されていない。よって、乳腺分泌上皮細胞における Kir チャネルの機能的発現を初めて示した本研究成果は、乳汁分泌機構を明らか

にする上で、非常に重要な基礎的知見となる可能性がある。

また、Kir2.1 の発現は妊娠から泌乳に至る過程で、強く誘導されることが示唆された。この発現は、妊娠初期の乳腺発達に重要なエストロゲンとプロゲステロンの投与だけでは十分に引き起こすことができなかった。発現調節に関与する他のホルモンや局所因子の存在が考えられた。それらについてはさらなる検討が必要である。

ところで、Kir チャネルは心筋細胞や骨格筋細胞、神経細胞など多様な細胞で静止膜電位の形成に寄与し、細胞の興奮性を調節することが知られている。乳腺上皮細胞の細胞生理機能や、乳腺組織の泌乳機能における Kir チャネルの役割は大変興味深く、今後の検討課題である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上川 昭博 (KAMIKAWA AKIHIRO)

帯広畜産大学・畜産学部・助教

研究者番号：30581665