

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2015

課題番号：24657044

研究課題名(和文) 乳汁分泌活性化機構の解明に向けた細胞培養系の確立

研究課題名(英文) Cell culture method for the study of secretory activation in mammary epithelial cells

研究代表者

松田 学 (Matsuda, Manabu)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：30282726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：乳腺上皮細胞は、特定の刺激条件が揃えば乳汁の合成と分泌を行うが、条件がひとつでも欠ければ、それを感じ、乳汁合成を停止させる。本研究では、インスリンおよびコルチゾルといった体制ホルモン、および内性因子であるヒスタミンシグナルが、乳腺上皮細胞の極性を高めることを通して、乳汁合成の開始に寄与することが明らかとなった。これらのシグナルは、生体組織の乳腺で乳汁分泌に必要な条件ではあるが、培養した乳腺上皮細胞に盛んな乳汁分泌を促す十分条件ではないことがわかった。乳汁を生産するバイオリアクターの開発には、さらなる研究が必要である。

研究成果の概要(英文)：Mammary epithelial cells produce and secrete milk in response to a full set of appropriate systemic and local stimuli. Lack of one of the necessary signals attenuates full activation of lactation. Here, it has been revealed that local signals such as histamine/H1 receptor, in addition to systemic hormone such as insulin and cortisol, contribute to milkstasis via maintaining polarity of the mammary epithelial cells. Although all of these signals were found to be necessary for milk secretion in vivo, the best cocktail of these factors were not yet sufficient to make mammary epithelial cells produce abundant milk in vitro. Innovation of bioreactor to produce milk awaits further studies.

研究分野：mammary biology

キーワード：lactation tissue culture milkstasis histamine

1. 研究開始当初の背景

(1) 泌乳という現象は、哺乳動物が乾燥した陸上環境で仔を育む生殖戦略において、胎生の獲得とともに重要な位置を占めている。乳汁を合成し分泌するのは乳腺上皮細胞であり、細胞内外の様々な情報を統合して泌乳に向けた最終決定を下すのも、乳腺上皮細胞である。したがって、乳腺上皮細胞だけをインビトロ培養して、適切な環境刺激を与えさえすれば、乳汁を合成し分泌することが予想される。そして、これを応用すれば動物種に応じた多様なミルクを生産するバイオリクターを開発できるものと期待される。しかし、適切な環境刺激カクテルのレシピを、私たちはまだ手に入れていない。

(2) 乳汁分泌の生理および乳腺の形態変化を担う体制シグナルは、私も参画したこれまでの多くの研究によりほぼ明らかにされたと思われる。一方、そのシグナルは泌乳調節のスイッチとして機能しているだけであり、乳腺自体には、体制シグナル入力によって稼働するプログラムが備わっている(図1)。この乳腺自体に備わる半自律的な泌乳プログラムについては未解明な部分が多い。乳汁分泌は母体にとってランニングコストの高い営みであり、無駄に泌乳することがないように乳腺には泌乳を停止させる機構がいくつも備わっていて不思議はない。栄養不足やストレスといった全身の環境変化だけでなく、炎症、蓄乳(子の離乳)、乳管閉塞などの乳腺局所における様々な環境変化に対応して、乳腺上皮は泌乳を停止させることができる。私は、こうした乳腺局所の泌乳プログラムの理解を進めて、泌乳停止スイッチを全て解除しつつ、泌乳を促す刺激を与えることで、培養乳腺上皮細胞を泌乳に向かわせることができるようになると思った。

(3) 本研究の契機となったのは、ヒスタミン合成酵素(HDC)欠損マウスが泌乳異常を示すという現象である。HDCを欠損すると、仔が出生3日程度までに死亡するが、私はそれが乳汁分泌不全によるものであり、且つ、中枢ヒスタミンニューロンの活動低下に起因するものではなく、末梢のヒスタミンが関与している可能性が高いことを突き止めた。乳腺ヒスタミンが作用する仕組みを知ること、乳腺局所の泌乳プログラムの理解が進み、バイオリクター開発の夢に一歩近づくのではないかと考えるに至った。

2. 研究の目的

(1) 授乳中の個体にみられるような盛んな泌乳を培養細胞に再現させることはできない。これは、乳腺の分泌活性化の分子機構に関する我々の知識不足と表裏である。本研究では、泌乳期の乳腺が代謝中枢器官として捉え直し、そこには多様なミルクスタシス調節機構が内在するという想定に立って、培養系を一

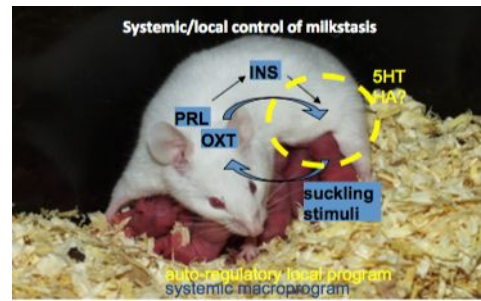


図1. 泌乳制御の模式図

から構築し直すことを試みる。私自身が発見したモノアミン合成酵素欠損による泌乳異常という現象を足がかりとし、乳腺培養細胞を盛んな泌乳へと導く技術開発を目指した試行錯誤を通して、泌乳調節の仕組みおよびその進化の過程について考査することが大目的である。

(2) 上述の目的達成に向けての切り口として、本研究では、ヒスタミンが単離培養した乳腺上皮細胞に作用するかどうか、どのような作用を示すか、またどのような経路で作用をせしめるのか、を調べたいと考えた。さらに、ヒスタミンが泌乳に必須の役割を担うのであれば、その経路を阻害する要素を取り除けば、分泌活性化状態により近い状態に細胞を導く可能性があることから、培養条件の改良を行うことをひとつの目的とした。

(3) 盛んな乳汁合成、あるいは乳腺上皮の分泌活性化という状態に乳腺上皮細胞を導くには、まず、どのような状態が目的とする状態であるかを知るための指標が必要であると考え、マーカーとなるタンパク質を得て、培養条件のスクリーニングに活用することを目的とした。

(4) 様々な条件下で乳腺上皮細胞を培養し、より乳汁分泌活性化状態に近い培養条件を探すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 株化ヒト乳腺由来細胞を諸条件下において Transwell 上で極性培養した(図2)。細胞極性形成に重要な密着結合(TJ)のインテグリティを調べるため、上皮細胞シートを挟んだ電気抵抗値(TEER)を測定し、指標に用いた。

(2) マウスの泌乳中の乳腺でのみ発現する遺伝子を過去の cDNA マイクロアレイデータから探索し、候補となる遺伝子を決定した。各々につき、RT-PCR 法及び抗体によるタンパク発現解析により、泌乳指標遺伝子としての有用性を検証した。

(3) 株化ヒト乳腺由来細胞の性質が変容したこともあり、マウス乳腺上皮初代培養細胞、

ウシ乳腺上皮由来細胞、ヒト乳腺初代培養細胞の培養条件をマニピュレートし、TEER および泌乳指標遺伝子の発現に対する培養環境因子の影響を調べた。

(4)多くはネガティブデータに終わったが、低温ゾル化ゲル上培養やハンギングドロップ培養、PVDF フィルター上組織培養など、いくつかの培養法で、環境パラメータを変化させた時の乳腺上皮の分泌活性化への影響を検討した。

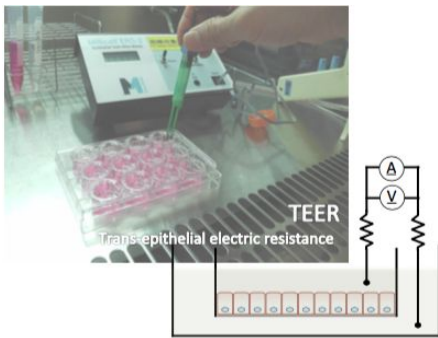


図 2 . TEER 測定法

4 . 研究成果

(1)乳腺ヒスタミンは H1 受容体を介して TJ の強化を促す__培養したヒト由来乳腺上皮細胞の細胞極性形成に対するヒスタミン受容体阻害剤の影響を調べた。その結果、I 型から IV 型の 4 種類の受容体のうち、I 型に対する阻害剤だけが細胞 TEER に影響を示し、TEER を低下させた (図 3)。また、H1 受容体作動薬は TEER の増大作用を示した。さらに、乳腺上皮細胞では、H1 受容体と H2 受容体が発現しており、泌乳ホルモン刺激により、H1 受容体がドミナントになることを発見した。これらの実験結果から、ヒスタミン/H1 受容体シグナルは泌乳ホルモンにより亢進し、密着結合 (TJ) および細胞極性の維持に重要な働きをしていることが示唆された。

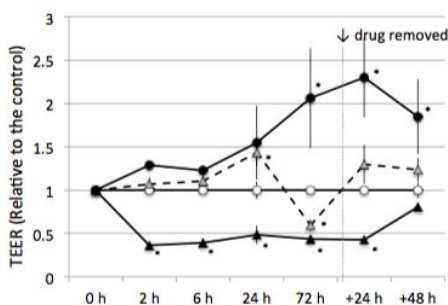


図 3 . H1 薬剤の細胞極性への影響

(2)乳腺ヒスタミンは細胞内で機能して TJ 強化を促す__ヒスタミンの細胞内受容体 HIC とよばれる P450 系ヒスタミン結合タンパク質がある。ヒスタミンと HIC の結合阻害剤 DPPE の、乳腺上皮 TEER に対する影響を調べたと

ころ、TEER の低下が観察された。この結果は、HDC-KO マウスでみられた観察結果と符合する点が多い。

(3)p38MAPK-TJP1 は、ヒスタミン/HIC シグナルによる乳腺上皮 TJ のイオン透過性変化に關与する__HIC 阻害剤による TEER 低下に伴う TJ 関連遺伝子の mRNA 発現量の解析から、いくつかの遺伝子の顕著な発現変化がみられた。TJ の透過性増大と、Tjp1 の mRNA 量の増加には矛盾がみられたが、その後の Tjp1 タンパクの量の顕著な減少が認められた。HIC 阻害剤依存的な Tjp1 タンパクの減少と TEER 低下は、p38MAPK 経路の阻害によりみられなくなった。また、HIC 阻害剤により p38MAPK のリン酸化 (活性化) が亢進することを見出した。ことから、ヒスタミン/HIC シグナルは、p38MAPK 経路を抑制することで Tjp1 タンパクの増加を伴う TJ のインテグリティ増大を引き起こしているという、新しいヒスタミンの情報伝達経路の存在が示唆された。Hdc-ko マウスでは、この経路が阻害されることで完全な分泌活性化が起こらずに、泌乳量が顕著に減少し、仔が育たないものと考えられた (図 4)。

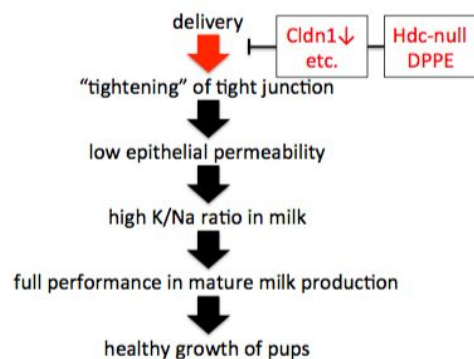


図 4 . H1 薬剤の細胞極性への影響

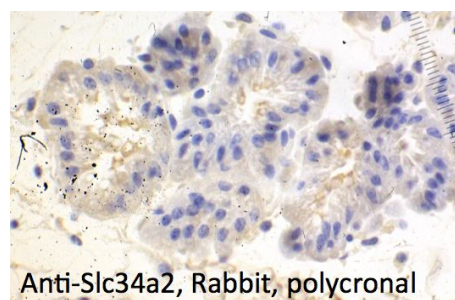


図 5 . マウス乳腺リン酸輸送体の発現

(4)リン酸輸送体タンパクは盛んな泌乳状態の分子指標となる__泌乳の指標として乳汁タンパク以外の乳腺上皮細胞のタンパク mRNA をマイクロアレイデータをもとに探索した。その結果、ドーパミン受容体 4 型、カルシウムポンプ 2 型、リン酸イオン輸送体 2 型など、複数の候補 mRNA が泌乳開始に伴

い非常に顕著に増大することがわかった。そのなかでも最後者は、タンパク発現のレベルでも泌乳の ON/OFF にシャープに反応する良い指標となることを明らかにした(図 5)。このリン酸輸送体は、乳汁内のカルシウム濃度を高めても石灰化しないよう pH 調節に重要な働きをもっていると考えられる。

(5) 乳腺のヒスタミンシグナルは哺乳動物で保存されている__ヒト株化細胞の性質が変容したこともあり、ヒト初代培養細胞、マウス初代培養細胞、ウシ細胞株について、ヒスタミン作用の検証と比較を行った。乳腺上皮細胞は種類によらず、HIC 阻害剤と H1 阻害剤に感受性を示したが、その度合いは細胞により異なった。細胞種による違いは、動物種の違いというよりは、むしろ用いた細胞の発達段階の違いかもしれない。

(6) 体制的泌乳ホルモンは乳腺ヒスタミンシグナルを介して乳腺上皮の状態を調節する__ウシ乳腺上皮細胞株では、プロラクチン、インスリン、コルチゾルの泌乳ホルモンカクテルによる TEER の顕著な増大が認められた。さらに、これには、Cldn3 などの TJ 関連遺伝子の発現が深く関与していることがわかった。また、より詳細な解析から、この現象には、3 種の体制ホルモンのうち、インスリンとコルチゾルが主に寄与していることが判明した(図 6)。ホルモンカクテルは、H1 受容体の発現亢進に働くことも明らかとなった。この情報経路は、泌乳ホルモンによる乳腺上皮活性化の促進作用を担保する重要な機構だと考えられる。

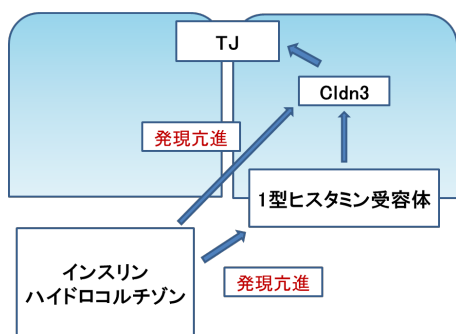


図 6 .泌乳ホルモンによる乳腺ヒスタミン経路の機能修飾

(7) このほか、Transwell 培養以外の極性培養法を用いて、セロトニンの受容体やドーパミンの受容体の作動薬・阻害薬をはじめ、多くの研究を実施したが、多くは TJ 形成に影響を及ぼさなかったことから、ヒスタミンシグナルによる乳腺上皮細胞の生理機能に対する影響力の大きさが浮き彫りになった。また、組織培養の習得の一環として、乳腺以外の組織でも実績のある培養法を試行した。その過程で、発達中の膺上皮の分化に対するピタミ

ン D の影響力の大きさの理解に至った。

(8) 現象の理解と現象を再現する培養系開発は、ちょうど卵と鶏の関係にある。本研究は乳腺分泌活性化の研究分野において、その最初の卵を育てる過程であり、今後の広範な後続研究を刺激することが期待できる点において非常に意義がある。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Manabu Matsuda, Keiko Kurosaki, Naomichi Okamura. Activated vitamin D3 and pro-activated vitamin D3 attenuate induction of permanent changes caused by neonatal estrogen exposure in the mouse vagina. The Journal of Reproduction and Development 60(4):274-279 (2014) (査読有) DOI:10.1262/jrd.2014-015

〔学会発表〕(計 10 件)

Manabu Matsuda. Effects of histamine receptor antagonists on the ion-permeability of bovine-, mouse- and human-derived mammary epithelial cell sheets. 第 46 回乳腺泌乳研究会、2015 年 12 月 5 日、東京大学(東京都・文京区)

Tasuku Nemoto, Manabu Matsuda. Involvement of histamine-signaling via histamine receptor type 1 in systemic hormone-induced integration of blood-milk barrier in bovine mammary epithelial cells. 第 46 回乳腺泌乳研究会、2015 年 12 月 5 日、東京大学(東京都・文京区)

松田 学, 根本侑玖, ヒスタミンは複数の経路により乳腺上皮細胞のイオン透過性に影響する、第 86 回日本動物学会新潟大会、2015 年 9 月 19 日、朱鷺メッセ(新潟県・新潟市)

松田 学, マウス乳腺リン酸輸送体の発現、第 45 回乳腺泌乳研究会、2014 年 11 月 8 日、東京大学(東京都・文京区)

松田 学, 井上尚哉, 岡村直道, マウス乳腺の分泌活性化に伴うリン酸輸送体の発現変化、第 85 回日本動物学会、2014 年 9 月 13 日、東北大学(宮城県・仙台市)

松田 学, 葛西裕亮, 井上尚哉, 岡村直道, 乳腺のヒスタミンシグナル阻害による密着結合関連遺伝子の発現変化、第 66 回日本動物学会関東支部大会、2014 年 3 月 15 日、早稲田大学(東京都・新宿区)

井上尚哉, 葛西裕亮, 岡村直道, 松田 学, MCF-10A 細胞におけるヒスタミンの作用経路、

第 84 回日本動物学会、2013 年 9 月 27 日、岡山大学（岡山県・岡山市）

葛西裕亮，岡村直道，松田 学「ヒト乳腺上皮由来 MCF10A 細胞の上皮膜透過性に対するヒスチジン受容体阻害剤の影響」第 65 回日本動物学会関東支部大会、2013 年 3 月 16 日、東京工業大学（東京都・目黒区）

松田 学、マウスおよびウシにおける乳腺上皮透過性に対するヒスタミンの作用、日本比較内分泌学会、2012 年 11 月 30 日、福井大学（福井県・福井市）

松田 学、乳腺上皮細胞の透過性に対するヒスタミンシグナル阻害の影響、第 83 回日本動物学会、2012 年 9 月 13 日、大阪大学（大阪府・吹田市）

6．研究組織

(1)研究代表者

松田 学（MATSUDA, Manabu）
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：3 0 2 8 2 7 2 6

(2)研究協力者

葛西 裕亮（KASAI, Hiroaki）

井上 尚哉（INOUE, Naoya）

根本 侑玖（NEMOTO, Tasuku）

岡村 直道（OKAMURA, Naomichi）