

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780281

研究課題名(和文)タイトジャンクションが乳腺腺胞細胞の乳汁分泌能を調節する機序の解明

研究課題名(英文)Influence of tight junctions on milk secretion ability in lactating mammary alveolar epithelial cells

研究代表者

小林 謙 (KOBAYASHI, KEN)

北海道大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：30449003

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：乳汁とは泌乳期乳腺の腺胞上皮細胞から分泌される液体である。泌乳期乳腺では分泌した乳汁が体内に逆流することを防ぐため、乳腺胞上皮細胞間に逆流を防止するバリアを発達させる。本研究ではこのタイトジャンクション(TJ)が泌乳期乳腺の乳汁分泌能に果たす役割を解明する為、TJを構成するクロードインに着目して調べた。

その結果、クロードイン-3が泌乳期乳腺のTJを構成すること、クロードイン-4の発現量増加がバリア脆弱化を誘導すること、クロードイン-4の発現が乳汁分泌能を調節する多様な生理活性物質によって制御されることがわかり、TJと乳汁分泌能が分子レベルで高度に連動していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Alveolar epithelial cells (AECs) secrete milk components for suckling infants in lactating mammary glands. AECs developed tight junctions (TJs) to prevent back-flow of milk from the alveolar lumen to the body. In this study, influences of tight junctions on milk secretion ability in lactating mammary alveolar epithelial cells were investigated.

The results showed that TJs in lactation mammary glands consist of claudin-3 where claudin-4 causes weakness of TJ barrier. Furthermore, the expression level of claudin-4 was regulated by several physiological active substances, which have been known to regulate milk secretion ability in AECs. Therefore, close relationship of TJs with milk secretion ability in AEC is suggested.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：乳腺 タイトジャンクション クロードイン 乳汁 乳房炎 ミルク 泌乳 泌乳期

## 1. 研究開始当初の背景

(1) タイトジャンクション (TJs) は上皮細胞層の細胞間隙をシールする構造物であり、上皮層の傍細胞経路を介した物質移動を制御している構造物である。泌乳期乳腺において乳汁を分泌する腺胞上皮細胞の細胞間隙にも TJs は存在しており、乳汁が体内に逆流することを防ぐ milk-blood barrier として機能している。この TJs による milk-blood barrier は泌乳期特異的であり、分娩前や離乳後など乳汁を分泌しない時期の乳腺胞上皮細胞は milk-blood barrier を備えていない。また、milk-blood barrier は乳房炎時に破綻することが知られており、乳房炎発症のウシでは乳汁の低下とともに血液中に乳成分である乳糖、乳汁中に多めのアルブミンが検出される。すなわち、乳腺胞上皮細胞の TJs は泌乳期乳腺における乳汁の体内への逆流を防ぐ必要不可欠な構造物である。

(2) TJs の物質透過性は TJs を構成する膜貫通型タンパク質であるクローデインやオクルーデインによって決定される。特にクローデインには 24 種類のサブタイプが存在し、その組み合わせによって生体組織の多様性に応じた TJs の物質透過性を決定している。TJs 中のクローデイン組成はホルモンや炎症成分など多種多様な因子によって変化することが知られており、生体中の幅広い生理条件の変化に対応した TJs の物質透過性を可能にしていると考えられている。

(3) 泌乳期乳腺の発達や退縮にはプロラクチンやプロゲステロンなどのホルモン、EGF や IGF などの成長因子、TNF や LIF などのサイトカインが関与している。また、乳房炎を発症した泌乳期の乳腺では IL-1 や IL-6 などの炎症性サイトカインも確認される。前述したように泌乳期の乳腺胞上皮細胞には乳汁の逆流を防ぐためのタイトな TJs が存在する。しかし、分娩前や退縮期の乳腺、あるいは乳房炎を発症した乳腺では TJs バリアの脆弱化が起こる。しかし、このような変化の際に TJs のクローデイン組成がどのように変化するかわかっていない (2011 年時点)。

## 2. 研究の目的

(1) 乳汁とは泌乳期乳腺由来の分泌液であり、新生児が離乳するまでの重要な栄養源である。またウシやヤギから得られる乳汁は非侵襲の畜産物として多様な乳製品の原材料となる。特に乳量や乳質は乳汁の経済的価値に直結しているため、飼料の消化・吸収メカニズムの解明、育種学に基づく品種改良、家畜行動学に基づく飼育法の改善など、多様な視点で研究されている。しかしながら、泌乳期乳腺において乳汁を分泌する乳腺胞上皮細胞に着目し、乳汁の質的・量的な調節を分子レベルで調べた報告は少ない。すなわち、

泌乳期乳腺における乳汁分泌機構を知ること、その学術的意義に加えて酪農分野の発展に寄与すると考えられる。

(2) そこで本研究では泌乳期乳腺における TJs の役割をクローデインに着目することによって分子レベルで調べる。まず、泌乳期前後に増減する生理活性物質や泌乳刺激が TJs のクローデイン組成に及ぼす影響について明らかにする。さらに、泌乳期乳腺の乳汁分泌能を低下させる乳房炎に着目し、乳房炎が TJs のクローデイン組成や Blood-milk barrier に及ぼす影響について明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) *in vitro* 培養モデルによる検討

非妊娠の ICR マウスより摘出した乳腺組織を細切後、2.5 mg/ml collagenase type III を含む RPMI1640 培地に浸漬して酵素処理を施した。処理後、密度勾配遠心法によって乳腺上皮細胞の画分を回収し、10 ng/ml EGF、10 µg/ml insulin、10% FBS を含む RPMI1640 培地で懸濁し、3 日間以内にコンフルエントに到達する密度で播種、培養した。培養 6 日後、プロラクチンやデキサメタゾンを含む分化培地と交換し、分化誘導した。

分化誘導前後あるいは分化誘導後に調べる対象の生理活性物質あるいはその阻害剤を培地に添加し、一定時間後に細胞層および培地を回収した。得られた細胞層はウエスタンブロッティング、免疫染色、quantitative-RT-PCR に供試した。また、培地中に含まれるカゼイン等の乳成分はウエスタンブロッティングおよび乳糖、トリグリセロイド定量キットを用いて測定した。

乳腺胞上皮細胞層の TJs の物質透過性を評価する為、経上皮電気抵抗値を測定した。その際、乳腺胞上皮細胞はセルカルチャーインサート上に播種し、上記と同じ条件で培養した。

### (2) *in vivo* モデルによる検討

泌乳期前後における乳腺 TJs のクローデインパターンを調べる為、妊娠後期、分娩前後、泌乳期および離乳期のマウス乳腺を採取した。なお、離乳期乳腺は泌乳 10 日目のマウスを強制離乳させたものを用いた。採取した乳腺はウエスタンブロッティング、凍結切片、パラフィン切片、および quantitative-RT-PCR に供試した。

泌乳期マウスに乳房炎の状態を誘導するため大腸菌由来のリポ多糖 (LPS) を泌乳 10 日目のマウス乳腺に投与した。投与後、一定時間後に乳腺を採取し、上記と同じ実験に供試した。

## 4. 研究成果

(1) 乳汁を分泌する乳腺腺胞上皮細胞は妊

娠中に増殖・分化し、分娩前後に乳汁分泌能を獲得する。しかし、乳腺胞上皮細胞の乳汁分泌能は離乳にともなって消失し、やがて乳腺胞細胞自体も消失する。この一連の流れの中で乳腺胞上皮細胞間に存在するTJsの構造的、機能的変化も起きることが知られている。しかしながら、乳腺胞 TJ を調節する因子や乳腺胞 TJ のクローディン組成と乳汁分泌能の関係など、いまだ不明な点が多い。そこで泌乳期前後の乳腺を採取し、クローディン組成を調べた結果、泌乳期特異的なクローディンパターンが存在することがわかった。分娩前、乳腺胞上皮細胞のTJsはクローディン3と4によって構成されていた。しかし、クローディン4は分娩後に次第に減少し、泌乳開始から数日後にはクローディン3主体のTJsに変化していた。クローディン3による乳腺胞TJsは泌乳期を通して維持されていたが、離乳からまもなくすると再びクローディン3の存在が観察された。すなわち、泌乳期乳腺における乳腺胞TJsはクローディン4によって構成されており、乳腺胞TJsによるmilk-blood barrierが脆弱化することが報告されている分娩前の離乳後の乳腺胞TJsではクローディン4も加わることがわかった。一方、妊娠後期や離乳後の乳腺胞のbasolateral membrane(側底部細胞膜)ではクローディン1も存在していたが、細胞膜頭頂部近傍にあるTJsには局在していなかった。さらに、クローディン7は妊娠期、泌乳期、離乳期のいずれの乳腺においてもbasolateral membrane(側底部細胞膜)に局在しており、クローディン1とともにTJsへの関与が示されなかった。

(2) 続いて、分娩前後および離乳後に増減する因子が泌乳期乳腺のクローディン4の発現量を調節していると考え、プロラクチン刺激によってリン酸化されるSTAT5aとコルチコイドと結合することによって核内移行するグルココルチコイドレセプター(GR)の挙動を調べた。その結果、プロラクチン/STAT5a経路およびコルチコイド/GR経路は泌乳期乳腺の乳腺胞上皮細胞で活性化している経路であることがわかった。そこで、乳腺胞上皮細胞の培養モデルを用いてプロラクチンおよびグルココルチコイドがクローディンに及ぼす影響を調べた結果、両ホルモンが存在する条件でクローディン4の発現量が減少することがわかった。一方、同じ条件でもクローディン3の発現量減少は認められず、泌乳期乳腺におけるクローディン組成はプロラクチンとコルチコイドによって調節されていることがわかった。経上皮電気抵抗値によるTJsのバリア機能を評価した結果でも両ホルモンの存在が泌乳期特異的なTJsの形成に必要であることが示唆された。さらに、プロラクチンの分泌を抑制するBromocriptineの腹腔内投与によってプロラクチン/STAT5a経路を不活性化した泌乳

期マウスの乳腺ではクローディン4の発現量が増加していたことから、この機序は生体でも起きていると考えられた。

(3) 乳房炎を発症した乳腺では乳汁分泌能の低下とともにmilk-blood barrierが脆弱化することが報告されている。そこで、乳房炎の起炎菌の一つである大腸菌のエンドトキシンであるLPSを泌乳期乳腺に投与して、クローディン組成やTJsの機能性に及ぼす影響を調べた。LPSを投与すると数時間後にクローディン4の発現量が急増し、その局在がTJsの存在する細胞膜頭頂部近傍と細胞膜側底部に観察された(図1)。一方、クローディン3はLPS投与前には細胞膜頭頂部近傍にのみ局在していたが、投与後には細胞膜側底部にも局在していた。また、このTJsの物質透過性を蛍光物質の投与によって評価した結果、LPS投与によるクローディン組成の変化と同調して乳腺胞上皮細胞間にあるTJsが脆弱化していることが確認された。また、LPS投与後のクローディン3がと細胞膜頭頂部近傍と側底部細胞膜に局在しており、さらにクローディン1と7も存在していた。このクローディンの発現パターンは分娩前や離乳後の乳腺と同じであった(図2)。TJsバリアの機能性の低下も認められたことから(図3)、乳房炎によるmilk-blood barrierの崩壊はクローディン組成の変化に起因すると考えられた。

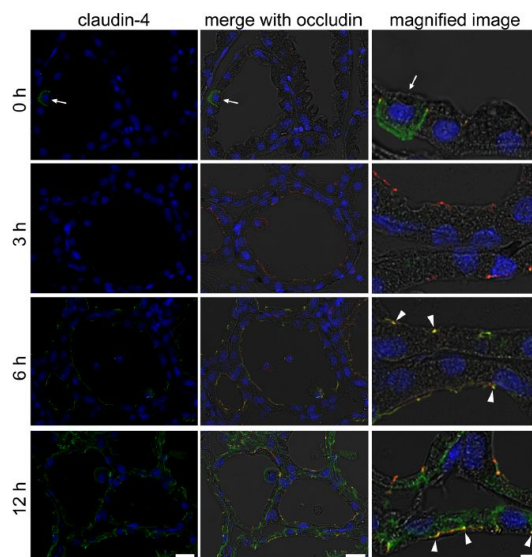


図1 LPSを投与した泌乳期乳腺におけるクローディン4の局在。Bar: 10 μm。Kobayashi K et. al., PLOS ONE, 2013 (主要論文3)より引用。

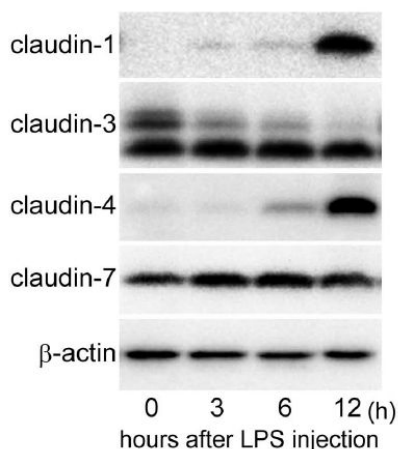


図2 LPS を投与した泌乳期乳腺におけるクローディン発現パターンの変化。LPS 投与後、クローディン-3 と-4 が増加することが確認される。Bar: 10  $\mu$ m。Kobayashi K et. al., *PLOS ONE*, 2013 (主要論文 3 )より引用。

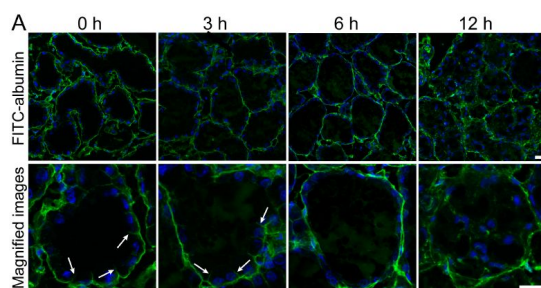


図3 LPS を投与した泌乳期乳腺における milk-blood barrier の脆弱化。LPS 投与後、乳腺腺胞内に蛍光物質が流入していることが確認される。Bar: 10  $\mu$ m。Kobayashi K et. al., *PLOS ONE*, 2013 (主要論文 3 )より引用。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

【査読有】

1. Kobayashi K, Oyama S, Uejyo T, Kuki T, Rahman MM, Kumura H (2013). Underlying mechanisms involved in the decrease of milk secretion during *Escherichia coli* endotoxin induced mastitis in lactating mice. *Veterinary Research*, 44, 119.  
DOI: 10.1186/1297-9716-44-119.

2. Kobayashi K, Uejyo T, Oyama S, Rahman MM, Kumura H (2013). Histological analysis of mammary gland remodeling caused by lipopolysaccharide in lactating mice. *Cell and Tissue Research*, 354, 495-506.  
DOI: 10.1007/s00441-013-1688-5.

3. Kobayashi K, Oyama S, Numata A, Rahman MM, Kumura H (2013). Lipopolysaccharide disrupts the milk-blood

barrier by modulating claudins in mammary alveolar tight junctions. *PLOS ONE*, 23, e62187.

DOI: 10.1371/journal.pone.0062187.

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 上條敬明、離乳後の乳腺における beta-カゼインと脂肪滴の継時的な局在変化、日本畜産学会、2013 年 9 月 9 日、新潟大学。

2. 大山翔子、分娩前後に増減する因子が beta-カゼイン分泌調節機序に及ぼす影響、日本畜産学会、2013 年 9 月 9 日、新潟大学。

3. 小林 謙、乳房炎モデルマウスを用いた乳分泌停止機序に関する研究、日本畜産学会、2013 年 9 月 9 日、新潟大学。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

所属研究室 HP

<http://www.agr.hokudai.ac.jp/animproduct/fooderm/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小林 謙 (Ken Kobayashi) ・北海道大学 ・大学院農学研究院 ・助教

研究者番号 : 30449003