

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660248

研究課題名(和文) ストレス妊娠における乳腺の「構造」と「機能」：新規分子作用の発見

研究課題名(英文) The "structure" and "function" of mammary gland in stress pregnancy

研究代表者

深水 昭吉 (FUKAMIZU, Akiyoshi)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：60199172

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)：妊娠中の乳腺は、出産後の授乳に備え、乳腺上皮細胞が増殖し、乳腺小葉と呼ばれる構造が形成され、母乳の産生が開始される。我々は高血圧妊娠マウスの妊娠中の乳腺を解析し、乳腺小葉の構造変化と、乳タンパク・乳脂肪の合成が、正常妊娠マウスに比べ、促進されていることを明らかにした。さらに、二種類の降圧剤投与実験により、乳腺の発達促進は、高血圧非依存的事であること、代表的な血圧調節ホルモンであるアンジオテンシンIIが、高血圧妊娠マウスにおける乳腺発達促進の責任因子であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Angiotensin II (AngII) has critical roles in regulation of blood pressure. We previously generated pregnancy-associated hypertensive (PAH) mice by mating female human angiotensinogen transgenic mice with male human renin transgenic mice. A recent study demonstrated that angiotensin II type 1 receptor (AT1) is expressed in mammary epithelial cells, however, the role of AngII-AT1 signaling in the development of mammary gland during pregnancy remains unclear. In this study, we analyzed the mammary gland of PAH mice. PAH mice exhibited precocious lobuloalveolar development and increased milk protein and lipid production, indicating that mammary gland development was accelerated in PAH mice. Furthermore, AT1 blocker treatment suppressed acceleration of mammary gland development in PAH mice, while antihypertensive drug hydralazine treatment did not. These data suggest that AngII-AT1 signaling accelerates mammary gland development during pregnancy through hypertension-independent mechanism.

研究分野：分子生物学

キーワード：高血圧妊娠 乳腺 レニン-アンジオテンシン系 授乳 アンジオテンシンII受容体

1. 研究開始当初の背景

(1) ほ乳類において、新生児(仔)の成長には母乳の供給、すなわち授乳が必要不可欠である。母乳の産生と射出を担う乳腺は、妊娠、授乳、離乳のサイクルの間に、その「構造」と「機能」が大きく変化する。妊娠中は、出産後の授乳の準備のために、乳腺上皮細胞が増殖し、乳腺小葉と呼ばれる構造が形成され、母乳の産生が開始される。授乳期間中は新生児(仔)の搾乳刺激により母乳の産生が維持されているが、離乳することで母乳の産生が止まり、乳腺上皮細胞の細胞死によって機能・構造ともに非妊娠時の状態へと戻る(退縮)。このような乳腺の変化は多くのホルモン-受容体シグナルによって制御されている。

(2) 我々は以前に、妊娠高血圧モデルマウスを作製し、解析を行ってきた。興味深いことに、この高血圧妊娠マウスによって哺育された里仔は、正常妊娠マウスによって育てられた里仔に比べて、体重増加が抑制されていることを見いだした。高血圧妊娠マウスは、授乳中は正常な血圧を示すことから、高血圧妊娠(=ストレス妊娠)マウスにおいては、妊娠中の乳腺発達抑制されている可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では正常妊娠マウスと高血圧妊娠マウス乳腺の「構造」と「機能」を解析し、乳腺の発達に対するストレスの影響を明らかにし、乳腺に作用する物質の同定と機能を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 雌のアンジオテンシノーゲントランスジェニックマウスと、雄のレニントランスジェニックマウスを交配し、妊娠高血圧マウス(交配により得られる妊娠マウス)を作製し、妊娠中の血圧を測定した。

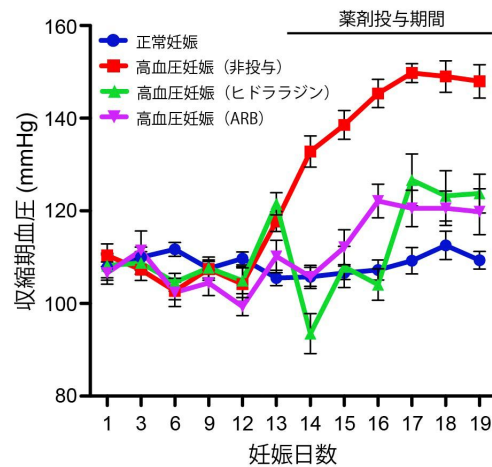
(2) 乳腺の構造変化を検証するため、非妊娠時、高血圧妊娠マウスにおいて血圧が上昇し始める妊娠13日目と、出産前日である妊娠19日目において乳腺を採材し、カーミン染色とヘマトキシリン・エオジン染色によって乳腺の形態を観察した。

(3) 乳腺の機能、特に母乳産生について評価するため、妊娠マウスより採材した乳腺を固定後、パラフィン包埋し、組織切片を作製し、免疫染色を行った。また乳腺より mRNA を抽出し、遺伝子発現解析を行った。

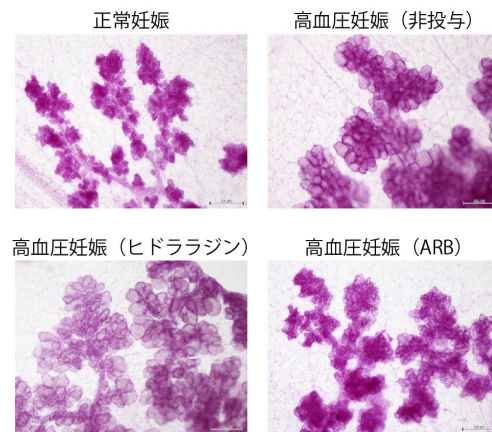
(4) 高血圧妊娠マウスにおいて、降圧剤投与の乳腺発達に対する影響を検証するため、ヒドララジン(レニン-アンジオテンシン系非依存的降圧剤)とアンジオテンシン II 1型受容体拮抗阻害薬(ARB)を投与した。降圧作用は血圧測定により評価し、乳腺の構造と機能に関しては、前述の方法にて評価を行った。

4. 研究成果

(1) 当研究室の先行研究と同様に、高血圧妊娠マウスは妊娠13日目以降に血圧の上昇が認められ、妊娠19日まで著しい高血圧を呈した。(下図)



(2) 続いて、高血圧妊娠が乳腺発達に与える影響を検証した。はじめに乳腺の形態学的解析を行ったところ、妊娠13日目においては、高血圧妊娠群と正常妊娠群の間で、乳腺の形態に差は認められなかった。一方、妊娠19日目においては、高血圧妊娠群において乳腺小葉の内腔が拡張していることが明らかになった(下図)。このような高血圧妊娠マウス乳腺の形態は野生型マウスの授乳中の乳腺の形態に類似していた。



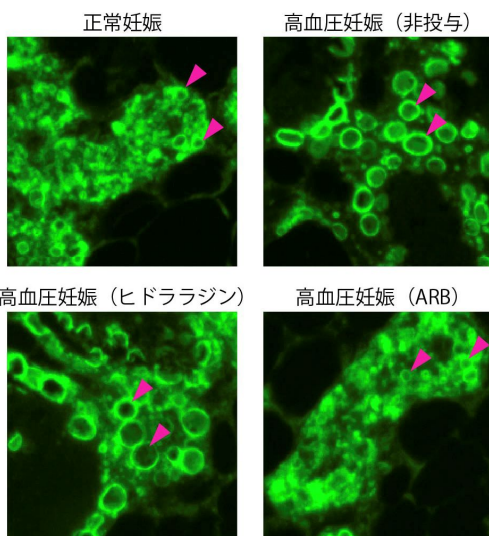
(3) 乳腺の母乳産生能に関して、母乳の主要な成分である乳タンパクと乳脂肪の合成を指標とし、評価を行った。

抗-乳タンパク抗体を用いた乳腺組織の免疫染色の結果、妊娠19日目において、高血圧妊娠マウス乳腺で、正常妊娠マウスに比べて、広い面積にシグナルが認められた。また、ラクトアルブミン(Lalba)、カゼイン(Csn2)、乳清酸性タンパク質(Wap)の遺伝子発現解析の結果、これらの遺伝子発現は高血圧妊娠マウス乳腺において上昇していることが判明した(Wap: 次頁右上図)。

妊娠中の乳腺における乳脂肪は、乳腺上皮細胞によって合成される。細胞内で合成され

た脂質は脂肪滴を形成し、細胞外（乳腺小葉内腔）へと分泌される。細胞内で合成された脂肪滴はアディポフィリンと呼ばれる脂質結合タンパク質に内包され、滴構造を維持している。乳腺における乳脂肪の合成を評価するため、抗-アディポフィリン抗体を用いた免疫染色により脂肪滴を可視化し、そのサイズを比較した。妊娠19日目において、高血圧妊娠マウス乳腺の脂肪滴は、正常妊娠マウスに比べ、明らかに肥大していた（下図）。さらに、脂肪滴の乳腺小葉への分泌に必須である Xdh、Btn1a1、Cidea の遺伝子発現レベルは高血圧妊娠マウスにおいて上昇していることが判明した（Btn1a1：右上図）。以上の結果をまとめると、予想に反して、高血圧妊娠マウスの乳腺発達に正常妊娠マウスよりも促進されていることが考えられた。

緑：アディポフィリン（脂肪滴）

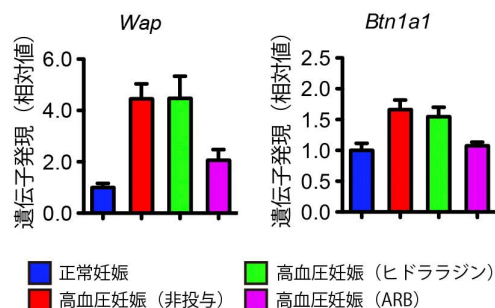


（4）高血圧妊娠マウスにおいて認められた乳腺発達の促進の責任因子を調べるため、降圧剤の投与を行った。

レニン-アンジオテンシン系非依存的降圧剤であるヒドララジンを投与したところ、高血圧妊娠マウスの血圧は正常妊娠マウスレベルまで低下した。一方で、乳腺の形態、乳タンパク・乳脂肪の産生に関しては、薬剤非投与の高血圧妊娠マウスと同程度であることが判明した。このことは高血圧病態とは異なる、乳腺発達促進因子の存在を示唆している。

続いて、高血圧妊娠マウスに対し、1型アンジオテンシン II 受容体拮抗阻害薬（ARB）を投与した。高血圧妊娠マウス ARB 投与群の血圧は、ヒドララジン投与群と同程度まで低下した。興味深いことに、ARB 投与群の乳腺の構造は、高血圧妊娠マウス非投与群・ヒドララジン投与群とは異なっており、正常妊娠マウスに類似していた。さらに乳タンパク・乳脂肪の合成も野生型マウスと同程度で有ることが判明した。ARB 投与群とヒドララジン

投与群で、血圧低下に差がなかったにもかかわらず、乳腺発達に ARB 投与による正常化されたことから、高血圧妊娠マウスにおける乳腺の発達促進はアンジオテンシン II の作用によることが明らかになった。



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）

〔雑誌論文〕(計1件)

1. Tanimoto, K., Kanafusa, S., Ushiki, A., Matsuzaki, H., Ishida, J., Sugiyama, F., and Fukamizu, A. "A mouse renin distal enhancer is essential for blood pressure homeostasis in BAC-rescued renin-null mutant mice." *J. Recept. Signal Transduct. Res.*: 34, 401-409 (2014), doi: 10.3109/10799893.2014.908917. (査読有)

〔学会発表〕(計13件)

1. Altansarnai Baasanjav 「妊娠高血圧マウスの乳腺発達に関する解析」、第19回アンジオテンシンカンファレンス、2015年2月7日、都市センターホテル（東京都）
2. 深水 昭吉 「エピゲノムによる生体機能調節」、第18回日本心血管内分泌代謝学会、2014年11月22日、横浜市開港記念会館（神奈川県）
3. 加香 孝一郎 「妊娠高血圧マウスにおいて増加するアミノプロダクトの同定」、第18回日本心血管内分泌代謝学会、2014年11月21日、横浜市開港記念会館（神奈川県）
4. Altansarnai Baasanjav 「妊娠高血圧マウスの乳腺発達に関する解析」、第35回日本妊娠高血圧学会、2014年9月20日、新宿京王プラザホテル（東京都）
5. 石丸 友博 「妊娠高血圧マウスに対する複数の降圧剤投与による病態改善効果」、第5回 Molecular cardiovascular conference II、2014年9月5日、神戸ベイシエラトンホテル（兵庫県）
6. Junji Ishida "Combinatorial treatment with antihypertensive drugs prevents HELLP syndrome exacerbated by endothelial dysfunction in pregnant"

- hypertensive mice.” International Vascular Biology Meeting 2014, 2014年4月14日、みやこメッセ（京都府）
7. 村田 知弥 “Lactation causes cardiac contractile dysfunction in mice with pregnancy-associated hypertension” 第51回 日本臨床分子医学会、2014年4月11日、東京国際フォーラム（東京都）
 8. 石丸 友博 「妊娠高血圧マウスの病態発症・進展に対する AT1 シグナル阻害効果の検討」、第51回 日本臨床分子医学会、2014年4月11日、東京国際フォーラム（東京都）

〔その他〕

ホームページ等

<http://aki f2.tara.tsukuba.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

深水 昭吉 (Fukamizu, Akiyoshi)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：60199172