

## 論文の内容の要旨

論文題目 Prolactin effects on alveolar budding and serotonin signal in the mammary gland

(乳腺の腺房形成とセロトニンシグナルへのプロラクチン作用)

氏名 今岡達彦

乳腺は、複雑に分岐した管状の上皮組織と、それを取り囲む脂肪組織からなる。その後の発達は三段階に分けられる。マウス新生仔の乳腺にはまだ上皮組織が浸潤していないが、春期発動以降、上皮組織が伸長と二分岐を繰り返して、脂肪組織を満たす。マウスの系統による違いはあるが、成熟期から妊娠期には細かい分岐と腺房の形成が始まる。そして妊娠期には腺房の上皮細胞が増殖・分化して、泌乳能をもった腺房が完成される。これらの発達過程は、女性ホルモン、黄体ホルモン、成長ホルモン、プロラクチン、上皮成長因子などによって調節されている。しかし腺房形成の最初期の段階 (alveolar budding) については不明な点が多い。近年創出されたプロラクチンノックアウトマウスには妊娠前にこの腺房形成が見られず、その回復にはプロラクチンの補填が必要であることから、プロラクチンがこれを調節していると考えられている。そこでこのモデルにおいて、プロラクチン補填による腺房形成にともなって発現が増加する遺伝子が探索され、コルタクチン結合タンパク質 90 (CBP90) とトリプトファン水酸化酵素 (TPH) が単離されている。本研究ではプロラクチンによる腺房形成を解析することを目的に、これらの遺伝子の発現と機能を解析した。

CBP90 はコルタクチンに結合するタンパク質として近年発見されたものであり、その機能は明らかにされていない。コルタクチンは細胞膜近傍に存在し、細胞外からの情報を細胞内部のアクチンフィラメントに伝達すると考えられる分子である。雌マウスの腎被膜下などに同系統の異個体の下垂体を移植すると、移植片からプロラクチンが放出されて血中プロラクチン濃度が高まり、乳腺の腺房形成を促すが、このとき CBP90 mRNA の発現も増加しており、その発現は乳腺の脂肪組織には見られなかった。また、女性ホルモン、黄体ホルモン、プロラクチンを様々な組み合わせで去勢した雌マウスに投与したところ、腺房が形成される条件下では必ず CBP90 mRNA の発現が見られ、腺房が形成されない条件下では発現が見られなかった。さらに免疫組織化学によって、CBP90 は腺房の上皮に多く、次いで乳管の上皮にも発現していることがわかった。これらの結果から、その機能はわからないものの、CBP90 は腺房形成の分子マーカーになりうると考えられる。

TPH はトリプトファンからセロトニンを合成する際の律速反応を触媒する酵素である。これが乳腺の上皮に存在し、プロラクチンを投与すると上皮のセロトニン含有量が増加することが先行研究でわかっているが、その発現調節機構および生理機能はまったくわかっていなかった。成熟処女マウスの乳腺上皮細胞の初代培養系においてプロラクチンは TPH 発現を誘導したが、それは 24~48 時間を必要とする緩慢な反応であり、用量依存性も確認された (図 1)。乳腺の発達や機能に関与する様々なホルモンや因子の影響をこの培養系を用いて調べたところ、インスリン、上皮成長因子、女性ホルモンの関与は見られず、黄体ホルモンと高濃度の糖質コルチコイドがプロラクチンによる発現誘導を抑制することが見

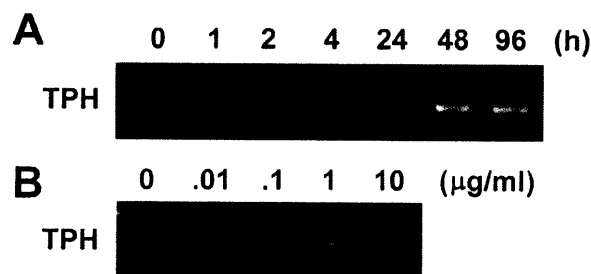


図 1 乳腺上皮細胞における TPH mRNA 発現のプロラクチンによる誘導  
成熟処女雌マウス (12 週齢) の乳腺上皮の初代培養細胞を用い、RT-PCR  
で TPH 発現を調べた。A は 1 µg/ml のプロラクチンを添加した後の時系  
列変化を、B はプロラクチン添加後 48 時間の用量依存性を示す。

出された。このことから TPH の乳腺における発現は、血中黄体ホルモン濃度の高い妊娠期には低く抑えられていると考えられる。また細胞内の代謝系や情報伝達系に作用する薬剤を用いて、プロラクチン刺激から TPH 発現の誘導にいたる機構を解析したところ、プロラクチンが乳汁タンパク質などの発現誘導に用いると考えられている Jak2/Stat5 系は用いられておらず、新規タンパク質の合成、タンパク質リン酸化、MAP キナーゼカスケードの活性化、ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼの活性化が必要であることが示唆された。すなわち、プロラクチン受容体から MAP キナーゼ系や Tec/Vav 系などを介して、TPH 遺伝子の転写促進因子が合成されるものと推測でき、プロラクチンは乳腺に対して Jak2/Stat5 系を介した直接作用とは別に、セロトニンを介した間接作用を引き起こすと考えられる。

そこで TPH が産生するセロトニンの機能を解析した。セロトニン受容体は 1~7 のサブ

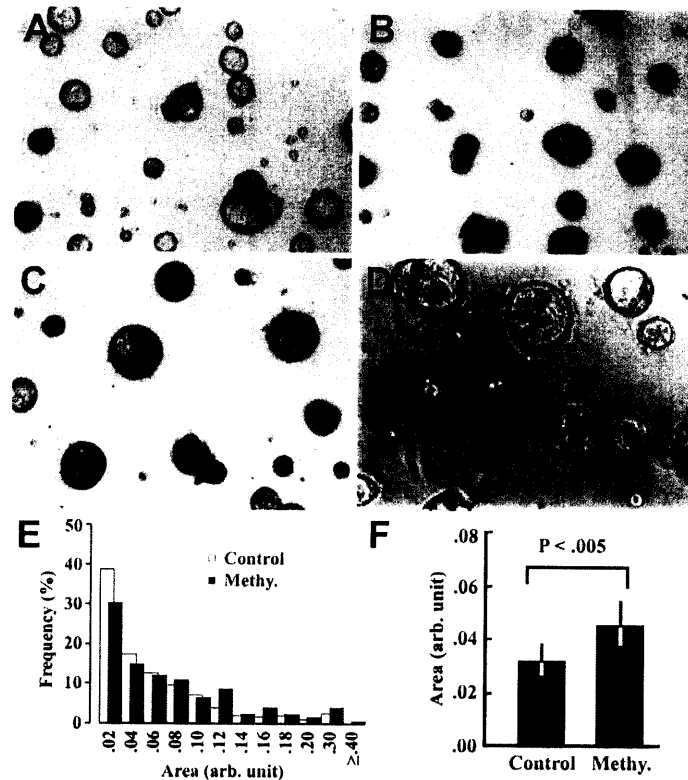


図 2 人工基底膜中の乳腺上皮細胞の形態に対するセロトニンの作用

12 週齢処女雌マウスの乳腺上皮の初代培養細胞に以下の処理を行った。

A, 対照; B, セロトニン処理; C, メチセルギド (methy) 処理; D, TPH 阻害剤処理; E, A と C のコロニーの大きさの分布; F, E の中央値 ( $P < 0.005$ )。

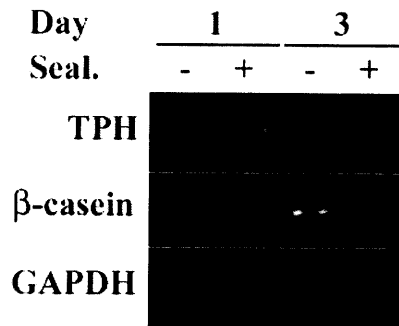


図 3 授乳期マウス乳腺での TPH 発現に対する乳汁貯留の影響

授乳第 3 日のマウスの片側の乳腺をシアノアクリレート樹脂で閉塞して乳汁を貯留させ (Seal.)、1 および 3 日後に乳腺における TPH および  $\beta$  カゼイン mRNA 量を測定した。内部標準にグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (GAPDH) を用いた。

タイプが知られているが、そのうち 3 を除くすべてが少なくとも RNA レベルではマウス乳腺に発現しており、同じセットが乳腺の脂肪組織にも発現していた。成熟処女マウスの乳腺上皮細胞を人工的に再構築された基底膜内で初代培養すると中空の球殻状のコロニーを形成するが、セロトニンはその形成を阻害し、セロトニン受容体 (サブタイプ 1, 2, 7) の拮抗剤であるメチセルギドはこれを膨張させた (図 2)。このとき乳腺上皮細胞では、乳汁タンパク質 ( $\beta$  カゼイン、乳清酸性タンパク質、GlyCAM-1)、水分輸送に関わるタンパク質 ( $\alpha$  ラクトアルブミン、乳糖合成酵素、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  アーゼ)、細胞接着分子 (オクルーディン) などの発現が増加し、泌乳機能が高まっていることを示した。またこのとき、細胞質内に多くの顆粒が観察された。そしてさまざまなセロトニン受容体サブタイプに特異的な拮抗剤を用いた実験から、この反応がおそらくサブタイプ 1 と 2 を介していることが示唆された。これらのことはセロトニンが乳腺内において泌乳抑制因子として作用することを示している。また乳腺における TPH の発現が乳腺内に乳汁が貯留したときに高まることがわかり (図 3)、乳腺における乳汁の貯留・除去のサイクルにおいて乳汁の産生を抑制するフィードバック因子としてセロトニンが機能している可能性が示唆された。

プロラクチン-セロトニンのこのような関係と機能はまったく新しい知見であり、乳腺の発達・機能を調節する新たな情報伝達機構として注目される。