

論文の内容の要旨

論文題目：乳牛の乳腺における副甲状腺ホルモン関連蛋白質（PTHrP）に関する研究

氏名：恩田 賢

副甲状腺ホルモン関連蛋白質（PTHrP）はヒトの肺癌株化細胞から見いだされた液性因子で、141個のアミノ酸からなる蛋白質である。本蛋白質は悪性腫瘍にともなう高カルシウム血症の原因物質の一つとして同定され、各種の腫瘍細胞から産生・分泌される液性因子であることが判明している。また、PTHrPは皮膚、ケラチノサイト、中枢神経、副甲状腺、膀胱、血管平滑筋、胎盤、子宮、授乳期の乳腺など多くの正常組織に存在することも明らかとなっている。PTHrPはN末端アミノ酸13残基のうち8残基がPTHと同一で、PTHレセプター（PTH/PTHrPレセプター）と結合し、PTH様作用を表す。したがって、PTH様作用には一般的にPTHrPのN末端が重要と考えられているが、乳腺ではPTHrP [1-108] や[1-141]など数種のPTHrPが産生されることからC末端の重要性が示唆されている。とくに、C末端ペプチドには骨吸収抑制作用が、また中間部のフラグメントには胎盤におけるカルシウム（Ca）の能動輸送に関連すると報告されている。牛では乳汁ならびに胎仔に多量のCa移送が必要であり、この不均衡は高泌乳牛に認められる低Ca血症の重要な因子と考えられている。一方、様々な動物で乳汁中のPTHrP濃度が著しく高いことが認められており、PTHrPは乳腺においてCa輸送に重要な役割を示すものと推測されているが、その実態は未だ明らかとはなっていない。

そこで、牛の乳腺における PTHrP の発現とその作用について、まず第 1 章では周産期の乳腺における PTHrP mRNA ならびに PTHrP の発現を、ついで第 2 章では周産期の乳腺における PTH/PTHrP レセプター mRNA の発現を、また第 3 章では C 端を含む牛 PTHrP [1-141] を合成し、これをスタンダードとして測定した乳汁中 PTHrP と Ca との関連を、さらに第 4 章では乳腺における Ca 輸送に対する PTHrP の作用について *in vitro* で検討した。

第 1 章. 周産期の乳腺における PTHrP mRNA ならびに PTHrP の発現

泌乳期および非泌乳期の乳腺、ならびに周産期の乳腺における PTHrP mRNA の発現をホルスタイン種乳牛 11 頭、ジャージー種乳牛 1 頭を用いて検討した。すなわち、泌乳期ならびに乾乳期の牛それぞれ 5 頭から局所麻酔下で乳腺組織を採取した。また、周産期の乳腺組織をホルスタイン種 1 頭ならびにジャージー種 1 頭から分娩前 2 ならびに 3 週と分娩後は 2 週おきに 4 回採取した。得られた乳腺組織について牛 PTHrP の DNA 配列を基に作成したプライマーを用いて RT-PCR で PTHrP mRNA の発現量を測定した。その結果、分娩前の PTHrP mRNA の発現はホルスタイン種ならびにジャージー種いずれにおいても低いものであったが、分娩後増加し、分娩後 5-6 週でピークを示した。また、その値はホルスタイン種に比較してジャージー種で高かった。一方、免疫組織学的に観察した PTHrP は、泌乳中の乳腺上皮細胞と管腔に認められ、非泌乳期の乳腺では認められなかった。したがって、PTHrP は牛の乳腺上皮細胞で産生・分泌され、乳汁分泌にともなって増加し、乳汁中に分泌されることが明らかとなった。これらのことから、乳腺で産生・分泌される PTHrP は乳腺ならびに乳汁中への Ca 輸送に関連するものと推測された。

第 2 章. 周産期の乳腺における PTH/PTHrP レセプター mRNA の発現

第 1 章の結果から、乳腺における PTHrP の産生・分泌は泌乳にともなって増加することが明らかとなったが、PTHrP の作用発現に必須のレセプターの発現は不明である。そこで、牛各組織ならびに周産期の乳腺における PTH/PTHrP レセプター mRNA の発現を乳牛で検討した。すなわち、妊娠していない乾乳期のホルスタイン種 1 頭から乳腺をはじめ心臓、肺臓、肝臓、脾臓、腎臓、子宮、卵巣、骨格筋、大脳、小脳、舌、食道、第 1 胃、第 2 胃、第 3 胃、第 4 胃、十二指腸、回腸、盲腸、結腸、ならびに直腸を採取した。また周産期の乳腺組織はホルスタイン種 1 頭、ジャージー種 1 頭から第 1 章と同様の方法で採取した。PTH/PTHrP レセプター mRNA の発現は、報告されているヒト PTH/PTHrP レセプターの DNA 配列を基に合成したプライマーを用いて検討した。その結果、PTH/PTHrP レセプター mRNA は各組織で発現しており、とくに肝臓、脾臓、腎臓、子宮、卵巣、乳腺、第三胃、盲腸で、その発現が強かった。また周産期の乳腺では、PTHrP mRNA の発現が分娩後、泌乳にともなって著しく増加するのに対し、

PTH/PTHrP レセプター mRNA の発現は周産期を通じて一定で、とくに変動は認められず、その発現には哺乳刺激、乳汁分泌による影響は少ないと考えられた。したがって、乳腺には PTH/PTHrP レセプターが発現しており、乳腺で産出・分泌される PTHrP により Ca 輸送が調節されていると推測された。

第3章. 乳汁中の PTHrP と Ca との関連

第1章、第2章の結果から、乳腺では PTHrP が産生・分泌され、また乳腺には PTH/PTHrP レセプターが発現しており、PTHrP が乳腺における Ca 輸送を調節していると推測された。そこで第3章では、乳汁中の PTHrP と Ca との関連を検討した。また、乳腺の Ca 代謝調節には PTHrP の C 端側のアミノ酸配列が重要と考えられていること、また一般にスタンダードとして用いられる PTHrP [1-87] は C 端側の PTHrP [1-141] と抗体との交差反応性が異なることから、牛 PTHrP [1-141] を合成し、スタンダードとして用いて PTHrP 濃度を測定した。まず、周産期の血中 PTHrP ならびに Ca の乳腺への取り込みについてジャージー種 1 頭を用いて、血中 PTHrP ならびに Ca 濃度について乳腺における動静脈差、すなわち腹腔動脈ならびに乳房静脈から血液を採取し、検討した。血中 Ca 濃度はこれまでの報告と同様に分娩前後に一過性の減少が認められたが、その低下時に Ca 濃度の動静脈差は認められず、乳腺への取り込みは明らかではなかった。一方、血中 PTHrP 濃度はいずれの時期においても検出限界以下 (0.28 pM/L) で動静脈差を検討することはできなかった。ついでホルスタイン種 9 頭について血中 PTHrP の動静脈差を検討するとともに、乳汁中の PTHrP ならびに Ca 濃度について検討した。その結果、血中 PTHrP の動静脈差は周産期のそれと同様いずれも検出限界以下であった。一方、乳汁中の PTHrP 濃度は著しく高く (平均 27,200 ± 7,920 pM/L、範囲 14,900 pM/L ~ 41,200 pM/L)、また Ca 濃度も著しい高値 (平均 1,000 ± 135 mg/L、範囲 772 mg/L ~ 1,200 mg/L) を示した。さらに、乳汁中の PTHrP 濃度と Ca 濃度との間には有意な正の相関 ($p < 0.01$) が認められ、乳腺の PTHrP は乳汁中の Ca 濃度の調節に関与しているものと考えられた。

第4章. 乳腺における Ca 輸送に対する PTHrP の作用

第3章の結果から、乳腺の PTHrP は乳汁中への Ca 輸送に関連すると考えられたので、乳腺における PTHrP の Ca 輸送に対する作用を、初代培養乳腺上皮細胞をコラーゲンコートした膜上で培養し、標識した Ca^{45} の移送について、開発した *in vitro* の系で検討した。すなわち、乾乳期の乳腺組織をコラゲナーゼで消化し、プロラクチン、インスリン、コーチゾン存在下で培養して乳腺上皮細胞を得た。得られた乳腺上皮細胞をコラーゲンコートした膜上で培養し、チャンバー法 (内側のチャンバーは乳腺上皮細胞で外側のチャンバーと接する) により、標識した Ca^{45} を内側あるいは外側のチャンバーに加え、PTHrP を添加した際の外側あるいは内側チ

チャンパー溶液中の Ca⁴⁵ 濃度を測定することで、Ca 移送に対する PTHrP の影響を検討した。その結果、内側のチャンパーに PTHrP を添加した場合には無添加の場合に比較して、外側チャンパー内溶液中の Ca⁴⁵ 濃度が増加した。また、外側チャンパーに PTHrP を添加した場合には無添加と比較し、内側チャンパー内溶液中の Ca⁴⁵ 濃度が増加した。したがって、乳腺上皮細胞を透過する Ca の方向性を明らかにすることはできなかったが、PTHrP は乳腺上皮細胞の Ca 移送を促進していることが明らかとなった。したがって、乳腺で産生・分泌される PTHrP は乳腺上皮細胞に作用し、その Ca 輸送を調節していると考えられた。

以上のことから牛の乳腺では PTHrP が産生・分泌され、乳汁中に分泌されるとともに PTHrP はオートクラインあるいはパラクラインにより、乳腺上皮細胞に作用し、乳汁中への Ca 輸送に密接に関連すると考えられた。