

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 恩田 賢

副甲状腺ホルモン関連蛋白質 (PTHrP) は悪性腫瘍にともなう高カルシウム血症の原因物質であるが、乳腺を含む多くの正常組織に存在することが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。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) 輸送に関連する。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、その実態は明らかでない。本論文は、牛の乳腺における PTHrP の発現とその作用について検討したもので、緒論ならびに総括を除いた以下の 4 章から構成されている。

第 1 章では、泌乳期および非泌乳期、周産期の乳腺における PTHrP mRNA の発現量をホルスタイン種乳牛 11 頭、ジャージー種 1 頭を用いて検討している。その結果、分娩前の PTHrP mRNA の発現量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。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ず、PTHrP は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を明らかにしている。

第 2 章では、PTHrP の作用発現に必須の PTH/PTHrP レセプター mRNA の発現をクローニングした PTH/PTHrP レセプター cDNA の遺伝子配列に基づいて作成したプライマーを用いて検討している。PTH/PTHrP レセプター mRNA は乳腺をはじめ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

乳腺組織では、周産期を通じて発現しており、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ている。

第3章では、乳汁中のPTHrPとCaとの関連を検討している。すなわち、周産期乳腺へのCa取り込みについて腹腔動脈ならびに乳房静脈の濃度差を検討し、分娩前後に血中Ca濃度の一過性の減少を認めたと、その低下時にCa濃度に動静脈差はなく、乳腺への取り込みは明らかではなかった。一方、合成した牛PTHrP [1-141] をスタンダードとしてPTHrP濃度を測定した血中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) であった。ついでホルスタイン種乳牛9頭について乳汁中のPTHrPならびにCa濃度について検討した。その結果、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濃度との間に有意な正の相関 ($p < 0.01$) を認め、乳腺のPTHrPは乳汁中のCa濃度の調節に関与していると考えている。

第4章では、乳腺上皮細胞における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、 ^{45}Ca の移送について開発した *in vitro* の系で検討している。その結果、内側のチャンバーにPTHrPを添加した場合には無添加の場合に比較して、外側チャンバー内溶液中の ^{45}Ca 濃度が増加し、外側のチャンバーにPTHrPを添加した場合には無添加と比較し、内側チャンバー内溶液中の ^{45}Ca 濃度が増加することから、PTHrPは乳腺上皮細胞のCa移送を促進していることを明らかにしている。

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ている。

このように、本論文は未だ明らかにされていない乳腺組織PTHrPの乳腺上皮細胞におけるCa輸送を促進する作用を明らかにしたものである。その内容は、獣医学の学術上貢献するものであり、よって、審査委員一同は、本論文が博士 (獣医学) の学位論文として価値あるものと認めた。