



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	乳腺上皮細胞の乳産生に対する植物エストロゲンの生理作用と作用機序の解明 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	津上, 優作
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第14384号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81101
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Tsugami_Yusaku_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称： 博 士（農学）

氏名 津 上 優 作

学 位 論 文 題 名

乳腺上皮細胞の乳産生に対する植物エストロゲンの生理作用と作用機序の解明

【背景】

乳牛が摂取する大豆や赤クローバーなどのマメ科植物には、植物エストロゲンが豊富に含まれている。植物エストロゲンの種類や含有量はマメ科植物の種類によって異なる。また、植物エストロゲンの一部はルーメン、下部消化管や肝臓で代謝され、別の植物エストロゲンへと変換される。そのため、マメ科植物を摂取した乳牛の生体内には、摂取したマメ科植物の種類や体内での代謝変換に応じて多種多様な植物エストロゲンが存在している。また、植物エストロゲンはエストロゲン活性に加えて、種類依存的に多様な生理活性を示すことが報告されている。これまで植物エストロゲンが性成熟期や妊娠期における乳腺発達に対して種類依存的に影響を及ぼすことが明らかになってきた。しかし、泌乳期の乳産生に対して個々の植物エストロゲンがどのような影響を及ぼすかはほとんど調べられていない。

泌乳期の乳産生は乳腺上皮細胞によって行われる。乳腺上皮細胞は、乳成分の材料であるグルコースやアミノ酸を側底部細胞膜に存在する膜タンパク質を介して細胞内に取り込み、細胞内で乳成分を合成し、頂端部細胞膜から細胞外へ分泌している。また、乳腺上皮細胞の細胞間隙に存在するタイトジャンクションは、乳成分と血液成分の漏出を防ぐとともに、細胞膜を頂端部側と側底部側に分けし、乳腺上皮細胞に細胞極性を付与している。以上のように、泌乳期の乳腺上皮細胞は乳産生に特化した性質を有する。しかし、泌乳期の乳腺上皮細胞に対して各植物エストロゲンがどのように影響するのかわかっていない。そこで本研究では、アルファルファに含まれるクメストロール、大豆に含まれるゲニステインとダイズイン、赤クローバーに含まれるビオカニン A とホルモノネチン、および代謝産物であるパラエチルフェノールとエクオールに着目し、泌乳期の乳腺上皮細胞に対する植物エストロゲンの作用を種類別に解明することを目的として、3段階の研究を遂行した。

1. 植物エストロゲンがマウス乳腺に及ぼす影響

まず、先行研究によって実験モデルが確立しているマウス乳腺上皮細胞の培養実験と泌乳期マウスへの投与実験を行った。培養実験の結果、植物エストロゲンがマウス乳腺上皮細胞の乳産生に対して種類依存的に作用することが明らかになった。大別すると、ビオカニン A、ゲニステインおよびホルモノネチンは乳産生に対して阻害的に、ダイズイン、パラエチルフェノールおよびエクオールは乳産生に対して促進的に作用していた。また、投与実験により、植物エストロゲンの種類依存的な影響が生体レベルでも確認された。さらに、ゲニステインの乳産生抑制作用が、乳産生を促進する転写因子である STAT5 の新規リン酸化の阻害と STAT5 量の減少によるものであることが明らかになった。以上より、植物エストロゲンは *in vitro* と *in vivo* の両方で種類依存的に特定の作用経路を介してマウス乳腺上皮細胞

の乳産生に影響を及ぼすことが判明した。

2. ウシ乳腺上皮細胞を用いた乳分泌モデルの作製とその有用性の検証

マウスの実験で得られた研究成果を畜産分野に応用するため、ウシ乳腺上皮細胞を用いた *in vitro* 乳分泌モデルの確立を試みた。その結果、細胞の足場としてコラーゲンを被膜したセルカルチャーインサートが適していること、培地添加成分としてグルココルチコイド類似物であるデキサメタゾンとプロラクチンを含むウシ脳下垂体抽出物が有効であることが明らかになった。作製した乳分泌モデルの乳腺上皮細胞は乳タンパク質、乳糖、乳脂質などの乳成分を分泌するとともに、強固なタイトジャンクションを形成し、側部細胞膜と頂端部細胞膜が分けられた明確な細胞極性を示した。また、作製した乳分泌モデルの生体反映性について乳房炎起炎菌毒素を用いて検証したところ、ウシ乳腺上皮細胞は生体同様に炎症反応を引き起こし、乳産生を低下させることが細胞内シグナル経路レベルで確認された。以上より、作製した乳分泌モデルは、生理活性物質などの外部刺激がウシ乳腺上皮細胞の乳産生に及ぼす影響を *in vitro* で調べる実験モデルとして有効であると判断された。

3. 植物エストロゲンがウシ乳腺上皮細胞の乳産生に及ぼす影響

作製した乳分泌モデルを用いて赤クローバーや大豆に含まれる植物エストロゲンとその代謝産物がウシ乳腺上皮細胞の乳産生に及ぼす影響を調べた。その結果、植物エストロゲンは乳産生を調節する転写因子の活性化/不活性化を誘導し、ウシ乳腺上皮細胞の乳産生を促進あるいは阻害することが明らかになった。特に、植物エストロゲンの代謝経路上流にあるビオカニン A やホルモノネチン、ゲニステインでは乳産生に阻害的な影響を示すことがわかった。一方、代謝経路の下流にあるエクオールやダイズインでは乳産生に促進的な作用が確認された。また、各植物エストロゲンがウシ乳腺上皮細胞の増殖性に及ぼす影響を調べたところ、パラエチルフェノールを除くすべての植物エストロゲンが、乳腺上皮細胞の増殖活性を低下させ、増殖性を制御する調節因子の活性化レベルをも低下させることが判明した。さらに、乳牛がマメ科植物を摂取した際の血中濃度を参考に調製した複数の植物エストロゲン混合物の実験では、単独の植物エストロゲンの影響がそのまま反映される場合や促進と阻害を示す植物エストロゲンの作用が相殺される場合があることが示された。以上より、植物エストロゲンはウシ乳腺上皮細胞の乳産生や増殖性に対して種類依存的に、かつ、複数存在下で複雑に影響を及ぼすことが明らかになった。

以上、本研究より、植物エストロゲンがマウスやウシ乳腺上皮細胞の乳産生に対して種類依存的に作用することが判明した。そのため、泌乳期の乳牛にマメ科飼料を給与する際には、含まれる植物エストロゲンの種類や量、および乳牛の植物エストロゲン代謝能力を考慮する必要があると考えられる。また、本研究で作製した乳分泌モデルは乳産生メカニズムを分子・細胞レベルで解明する研究に適していることが証明された。今後、この乳分泌モデルを活用することで、乳牛の乳生産性の向上に寄与する研究成果が得られることが期待される。