



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 [全文の要約]
Author(s)	津上, 優作
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/81102
Type	doctoral thesis
File Information	Tsugami_Yusaku_summary.pdf



学 位 論 文 内 容 の 要 約

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】

植物エストロゲンは、植物中に含まれる卵胞ホルモン類似物である。植物エストロゲンは乳牛が摂取するマメ科植物に多く含まれるが、その植物種によって含まれる種類や量が異なる。例えば、大豆にはゲニステインやダイズインが豊富に含まれ、赤クローバーにはホルモノネチンやビオカニン A、アルファルファにはクメストロールが多く含まれている。また、経口摂取したイソフラボン類は、そのまま体内へ吸収される場合と、ルーメンや下部消化管で代謝変換を受けた後に体内へ吸収される場合がある。さらに、消化管から吸収されたイソフラボン類は肝臓でも一部が代謝され、体内を循環する血液に移行する。消化管や肝臓におけるイソフラボン類の代謝変換には 2 つの経路が存在し、ビオカニン A-ゲニステイン-パラエチルフェノール経路とホルモノネチン-ダイズイン-エクオール経路である。したがって、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、生体内には多種多様な植物エストロゲンが存在することになる。

乳腺上皮細胞は、雌動物の乳腺胞や乳管などの乳腺実質を構成する主細胞であり、妊娠、分娩、泌乳および離乳に伴い、増殖、分化、乳産生、そして細胞死を繰り返す。性成熟期や妊娠期において、エストロゲンは、乳腺上皮細胞に発現するエストロゲン受容体 (ER) と結合し、その下流のシグナル経路を活性化することで乳管の伸長や分岐、乳腺胞の形成を調節している。エストロゲン活性を有する植物エストロゲンも乳腺上皮細胞の形態形成および乳腺組織の発達に関与することが知られている。しかし、泌乳期の乳腺上皮細胞が行う乳産生に対する植物エストロゲンの影響はほとんど調べられていない。

泌乳期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産生する。乳腺上皮細胞は乳成分の材料を側底部細胞膜に存在するトランスポーターやチャネルを介して細胞

内に取り込み、小胞体やゴルジ体で各乳成分を合成し、頂端部細胞膜から乳腺胞内腔へ分泌している。この一連の細胞極性が明確な乳産生には、タイトジャンクション (TJ)が必要不可欠である。TJ は乳腺上皮細胞の細胞間隙を埋めるように存在し、乳腺胞内腔側 (体外側) と間質側 (体内側)を物理的に隔離するとともに、乳腺上皮細胞の頂端部細胞膜領域と側底部細胞膜領域に局在する膜タンパク質を区分けすることで細胞膜に極性を付与している。TJ ストランド構造を形成するクローディンサブタイプの組成により、TJ のバリア強度や透過できる分子が決定されることが知られ、クローディン-3 とクローディン-4 が泌乳期の乳産生と密接に関わることが報告されている。

乳腺上皮細胞に乳産生能力と強固な TJ 形成を誘導するシグナル経路として、プロラクチン/STAT5 経路とグルココルチコイド/グルココルチコイド受容体 (GR)経路が知られている。プロラクチン/STAT5 経路では、まずプロラクチンがプロラクチン受容体に結合することでヤヌスキナーゼ 2 が活性化し、STAT5 のチロシン残基をリン酸化する。その後、リン酸化された STAT5 は、二量体を形成して核内移行し、転写調節因子として乳成分合成に関わる遺伝子群の転写を活性化する。また、グルココルチコイド/GR 経路では、細胞質の GR がグルココルチコイドと結合することで核内移行し、転写調節因子として機能するようになる。このグルココルチコイド/GR 複合体による転写調節因子は、二量体の STAT5 と相互作用することが知られており、両経路の活性化によって乳成分合成に関わる遺伝子群の転写がさらに幅広く活性化するようになる。

植物エストロゲンは、マメ科植物に豊富に含まれている生理活性物質である。また、イソフラボン類は、ルーメンや下部消化管、あるいは肝臓で代謝変換され、様々な種類のイソフラボン類が血液中を循環するようになる。これまでの研究から、植物エストロゲンが乳腺上皮細胞の増殖や細胞死を介して性成熟期や妊娠期における乳腺組織の発達を調節することが明らかになっている。また、植物エストロゲンはヒト結腸癌由来の Caco2 細胞、ブタ子宮内膜上皮細胞、ウシおよびヒト血管内皮細胞に作用し、それらの TJ バリア機能を調節す

るという報告もある。しかし、泌乳期における乳腺上皮細胞の乳産生能力や TJ バリア機能に対して、植物エストロゲンがどのように影響するのかを種類別に調べた例はない。

以上の背景から、本研究では植物エストロゲンが泌乳期のウシ乳腺上皮細胞に及ぼす影響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。まず、第1段階では先行研究で確立しているマウス由来乳腺上皮細胞を用いた *in vitro* 培養実験および泌乳期マウスへの投与実験を行い、乳腺上皮細胞および乳腺組織に対する植物エストロゲンの影響を種類別に細胞内シグナル経路レベルで調べた。続いて、マウス実験の研究成果をウシ由来乳腺上皮細胞に応用するため、乳産生能力と TJ バリア機能を兼ね備えた *in vitro* 乳分泌モデルを確立した。最後に、作製したウシ乳分泌モデルを用い、大豆飼料や赤クローバー飼料に含有される植物エストロゲンが乳牛の乳産生に及ぼす影響を分子・細胞レベルで調べた。

1. 植物エストロゲンがマウス乳腺に及ぼす影響

まず、乳分泌能を有するマウス乳腺上皮細胞の培養モデルを作製し、大豆やアルファルファなどに含有される植物エストロゲンがその乳産生能力に及ぼす影響を種類別に調べた。その結果、植物エストロゲンは乳タンパク質 (*Csn2*, *Wap*, *Lf*) の合成を促進するグループ (パラエチルフェノール、ホルモノネチン、ダイズイン、エクオール) と抑制するグループ (クメストロール、ビオカニン A、ゲニステイン) に大別されることが明らかになった。また、乳糖産生に関わる分子群 (*Glut1*, *Ugp2*, *Lalba*) はパラエチルフェノール、ダイズインおよびエクオールによって発現が促進されていたが、クメストロールおよびゲニステインでは阻害されていた。一方、乳脂質産生に関わる分子群 (*Slc27a3*, *Fabp3*, *Srebp1*) への影響は各植物エストロゲンで傾向が異なり、個々の植物エストロゲンでも促進する遺伝子と抑制する遺伝子があり、その作用に一貫性がなかった。さらに、これらの種類別の影響が生体レベルでも起きるかを検証するため、ゲニステイン、ダイズインおよびエクオールを泌乳期のマウスに腹腔内投与し、乳腺の乳産生能力に及ぼす影響を調べた。その結果、ゲニステイン

投与群では主要な乳タンパク質の mRNA 発現量が減少し、乳中のカゼイン量も減少していた。一方、エクオール投与群ではカゼインの mRNA 発現量が増加し、水・グリセロールチャネルの AQP3 発現量も増加していた。ダイズイン投与群では乳産生に対する顕著な影響は確認されなかったが、グルコース輸送体の GLUT1 の発現がゲニステイン同様に阻害されていた。以上より、各植物エストロゲンは *in vitro* および *in vivo* において種類依存的に乳腺上皮細胞の乳産生へ影響を及ぼすことが明らかになった。

植物エストロゲンが乳腺上皮細胞におけるクロードイン-3 とクロードイン-4 の発現パターンに及ぼす影響を調べたところ、各植物エストロゲンによってそれぞれ異なるパターンで増減することが確認された。特に、クメストロールではクロードイン-4 の増加、ゲニステインではクロードイン-3 の減少、ダイズインではクロードイン-4 の減少が確認された。TJ バリア機能への影響を経上皮電気抵抗値と FITC の透過性の測定により調べると、3 種類全ての植物エストロゲンで乳腺上皮細胞層のバリア機能が低下していることが判明した。各植物エストロゲンで影響の強さは異なっていたが、離乳後や乳房炎時と同様にクロードイン組成の変化を介して TJ バリア機能の調節が起きていると考えられる。

各植物エストロゲンが β -カゼイン産生と両転写因子のシグナル経路へ及ぼす影響を調べたところ、クメストロール、ビオカニン A、ゲニステインおよびホルモノネチンの 25 μ M 処理が β -カゼイン産生阻害とともに、活性型 STAT5 量も減少させることが明らかになった。一方、 β -カゼイン産生に対する影響が確認されなかったパラエチルフェノール、ダイズインおよびエクオールでは、STAT5 活性への阻害作用はなく、ダイズインでは STAT5 量が増加していた。また、プロラクチン受容体の発現量はクメストロールおよびゲニステイン処理によって減少し、ビオカニン A、ホルモノネチン、ダイズインおよびエクオール処理によって増加していた。さらに、グルココルチコイド/GR 経路では、クメストロール、ビオカニン A およびゲニステインは細胞内の GR 量を減少させ、エクオールはほとんど影響せず、パラエチルフェノール、ホルモノネチンおよびダイズインは GR 量を増加させていた。以上

のように、乳腺上皮細胞における β -カゼイン産生は、プロラクチン/STAT5 経路とグルココルチコイド/GR 経路の活性化/不活性化と一致していた。また、各植物エストロゲンがプロラクチン/STAT5 経路やグルココルチコイド/GR 経路へ及ぼす影響は種類別に異なっていた。さらに、エストラジオールによる両経路への影響はいずれの植物エストロゲンとも異なるパターンであることが確認された。これらのことより、植物エストロゲンは、プロラクチン/STAT5 経路とグルココルチコイド/GR 経路に対し、それぞれ特異的に作用して β -カゼイン産生を調節すると考えられた。

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

従来、ウシ乳腺上皮細胞における乳産生メカニズムを *in vitro* で調べるため、様々な培養モデルが作製されてきた。しかしながら、これらの培養モデルは乳腺上皮細胞の乳成分産生のみに着目しており、生体同様の細胞極性を再現するには至っていない。生体における泌乳期の乳腺上皮細胞は、側底部細胞膜から栄養素を取り込み、頂端部細胞膜から乳成分を分泌するという明確な細胞極性を有している。側底部細胞膜と頂端部細胞膜にはそれぞれ異なるトランスポーターやレセプターが存在し、TJ はこれらの膜タンパク質の配置を区別している。本研究の結果、このような細胞極性を有する生体反映性の高い乳分泌モデルを作製するためには、足場としてコラーゲンを被膜したインサートが最適であることを明らかにした。また、ウシ乳腺上皮細胞を泌乳ホルモンであるプロラクチンを含むウシ脳下垂体抽出物 (BPE) とグルココルチコイド類似物であるデキサメタゾン (Dex) 存在下で培養することも検証した。なぜなら、プロラクチンと Dex は STAT5 経路と GR 経路をそれぞれ活性化し、乳腺上皮細胞の乳産生能力や TJ 形成を誘導するからである。その結果、Dex/BPE 両処理群では β -カゼイン、ラクトフェリン、乳糖およびトリグリセリドが頂端部細胞膜から活発に分泌されていることが確認された。また、コラーゲンを被膜したインサート上の乳腺上皮細胞は、Dex 存在下で生体同様にクロロゲン-3 とオクルジンによる物質透過

性の低い TJ を形成した。一方で、クロードイン-1、-4、-7 は Dex の有無に関わらず細胞質や側部細胞膜に局在していた。TJ バリアの物質透過性は TJ を構成するクロードイン組成により決定される。そのため、Dex はクロードイン-3 の発現パターンを調節することによって生体同様に強固な TJ バリアの形成を誘導すると考えられる。さらに、TJ が形成された乳腺上皮細胞において、GLUT1 や Toll 様受容体 (TLR) などの膜タンパク質は生体同様に側部細胞膜と頂端部細胞膜に区別された局在パターンを示した。以上より、コラーゲンゲルで被膜したインサート上の乳腺上皮細胞を Dex および BPE 存在下で培養することによって、主要乳成分の分泌、TJ バリアの形成および細胞極性を生体同様に再現した乳分泌モデルを作製できることが明らかになった。

続いて、作製した乳分泌モデルの乳腺上皮細胞が外部刺激に対して生体同様の応答性を示すかを検証するため、リポ多糖 (LPS) およびリポタイコ酸 (LTA) に対する炎症応答の実験を行った。LPS と LTA はそれぞれ乳房炎起炎菌の *E. coli* および *S. aureus* の細胞壁成分である。乳腺上皮細胞は、乳腺内に侵入したこれらの細菌を感知するため、LPS 受容体である TLR4 と LTA 受容体である TLR2 を発現している。作製したモデルのウシ乳腺上皮細胞においても TLR4 と TLR2 は生体の乳腺胞と同様に頂端部細胞膜およびその近傍の細胞質に発現していた。そこで、これらの起炎菌毒素が乳腺上皮細胞の頂端部細胞膜から結合するようインサート内層のみに LPS および LTA の添加処理を行った。その結果、LPS と LTA の両方で STAT5 の不活性化と STAT3 の活性化が起きており、乳糖やトリグリセリドの分泌量も減少していた。STAT5 は乳産生を促進する転写因子であり、STAT3 は乳産生を抑制する転写因子である。STAT5 の不活性化と STAT3 の活性化は乳産生能力の低下とともに乳房炎時に認められる。また、乳分泌モデルを用いた実験では、LPS と LTA で乳産生に対して異なる影響も確認された。例えば、LPS 処理は β -カゼインの産生を低下させたが、LTA 処理はラクトフェリンの産生を増加させた。細胞内での脂肪滴サイズは LPS 処理群では拡大したが、LTA 処理群では細胞内トリグリセリド量が減少するとともに縮小した。さらに、

LPS と LTA では乳脂質産生に関わる分子群の mRNA 発現量への影響も異なっていた。*E. coli* 起因性乳房炎は *S. aureus* 起因性乳房炎より乳産生の低下が顕著であることが知られている。したがって、作製した乳分泌モデルにおける乳腺上皮細胞の乳産生は、生体同様に LPS と LTA に対して異なる様式で低下することが判明した。以上より、作製した乳分泌モデルは乳房炎起炎菌毒素に応答して、生体同様に乳産生を低下させることが示された。

さらに、作製した乳分泌モデルでは、乳腺上皮細胞の膜タンパク質が生体同様の局在パターンを示した。膜タンパク質の局在や機能は短時間で変化する場合が多く、生体のウシを用いて乳房炎発症直後の膜タンパク質の挙動を調べることは難しい。そこで、作製した乳分泌モデルを用いて *E. coli* 由来毒素の LPS がウシ乳腺上皮細胞の膜タンパク質の挙動に及ぼす影響を調べ、これまでに報告されていない炎症応答の新規知見が得られるかを検証した。乳成分合成に必要なグルコースや水・グリセロールはそれぞれ側底部細胞膜に局在する GLUT1 や AQP3 を介して取り込まれる。先行研究において、LPS を注入したウシ乳腺では GLUT1 の mRNA 発現量が減少することが報告されている。しかし、GLUT1 の細胞内局在や LPS が AQP3 に及ぼす影響はわかっていない。そこで乳分泌モデルを用いて調べた結果、LPS 処理したウシ乳腺上皮細胞において、側部細胞膜における GLUT1 と AQP3 の存在量が減少することが明らかになった。一方、乳腺上皮細胞に発現する GLUT1 と AQP3 の総量は変わっていなかった。乳腺上皮細胞における GLUT1 の局在はプロラクチン刺激により細胞質から細胞膜に移行し、AQP3 の細胞内局在もエピネフリン刺激により変化することが報告されている。泌乳期ウシ乳腺における GLUT1 はグルコース輸送の中核であり、GLUT1 の側底部細胞膜における局在が乳産生に重要であることも指摘されている。また、AQP3 は水とともに乳脂質の基質であるグリセロールを細胞内に取り込む。したがって、LPS に応答したウシ乳腺上皮細胞では、側部細胞膜に局在する GLUT1 や AQP3 が細胞質へ内在化することにより、乳成分合成に必要なグルコースやグリセロールの取り込みが抑制され、乳糖や乳脂質などの乳産生が低下することが新たに見出された。

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

ウシ乳腺上皮細胞をコラーゲンゲルで被膜したセルカルチャーインサート上に播種し、BPE や Dex 存在下で培養することによって TJ 形成と乳分泌を行う培養モデルの作製に成功した。また、乳分泌モデルは乳房炎起炎菌毒素に対する炎症応答を生体同様に再現することも確認された。そこで、新たに作製したウシ乳分泌モデルを用いて、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について調べた。なお、調べる植物エストロゲンとして、マウスモデルと同様にマメ科飼料に含有されるビオカニン A、ホルモノネチン、ゲニステイン、ダイズイン、およびそれらの代謝産物であるパラエチルフェノールとエクオールを選んだ。加えて、各植物エストロゲンがウシ乳腺上皮細胞の生存性・増殖性に及ぼす影響も調べた。さらに、大豆飼料および赤クローバーサイレージを摂取した後の乳牛における血中植物エストロゲン組成を *in vitro* で再現し、その植物エストロゲン混合物がウシ乳腺上皮細胞の増殖性と乳産生、およびその調節シグナルへ及ぼす影響についても検証した。

各植物エストロゲンが乳腺上皮細胞の乳産生やこれらのシグナル経路へ及ぼす影響を調べたところ、ビオカニン A は β -カゼインおよびラクトフェリンの産生量を減少させるとともに、STAT5 の不活性化と STAT3 の活性化を誘導した。ゲニステインは 10 μ M では β -カゼインの分泌量増加とともに STAT5 を活性化させたが、25 μ M では β -カゼインの産生を低下させ、STAT3 の活性化を引き起こしていた。ダイズインやエクオールの場合では STAT5 経路が活性化しており、*LALBA* が有意に増加していた。以上より、各植物エストロゲンは転写因子である STAT5、STAT3 の活性化/不活性化を介してウシ乳腺上皮細胞の乳産生に対して種類別に促進的にも阻害的にも作用することが明らかになった。

泌乳期間が長い乳牛では、マウスの場合とは異なり泌乳期においてもウシ乳腺上皮細胞は増殖活性を示す。また、乳腺上皮細胞の増殖性や生存性は EGF 刺激によって活性化する下流の ERK1/2 経路やインスリン刺激によって活性化する下流の AKT-mTOR 経路により

促進・維持されることが知られている。そこで、各植物エストロゲンが乳腺上皮細胞の増殖性とこれらのシグナル経路の活性化/不活性化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濃度依存的に乳腺上皮細胞の増殖を抑制することが判明した。また、パラエチルフェノールを除く各植物エストロゲン処理は AKT のリン酸化レベルを低下させていた。ほとんどの植物エストロゲンは ER との親和性を有し、下流の細胞内シグナル経路を調節する作用がある。以上のことから、パラエチルフェノールを除く植物エストロゲンは AKT 経路の不活性化を介して乳腺上皮細胞の増殖を抑制すると考えられる。一方、パラエチルフェノールはゲニステインの代謝物であるが、ER との結合能を有しておらず、ER 経路にほとんど影響を及ぼさない。そのためパラエチルフェノールでは AKT 活性や細胞増殖性に対する影響がほとんどなかったのかもしれない。さらに、ビオカニン A およびゲニステインで処理した乳腺上皮細胞は EGF 下流のシグナル分子である ERK1/2 のリン酸化レベルも低下していた。ビオカニン A やゲニステインは EGF 刺激によるチロシンキナーゼ活性の阻害作用を示すことが報告されている。そのため、ビオカニン A やゲニステインは ERK1/2 の阻害作用を示し、細胞増殖性だけでなく生存性にも影響を及ぼしたのかもしれない。以上より、植物エストロゲンは AKT 経路や ERK1/2 経路の活性化阻害を介して種類依存的にウシ乳腺上皮細胞の増殖性・生存性を低下させると考えられる。

マメ科植物は 1 種類だけではなく複数の植物エストロゲンを含んでいる。また、マメ科植物を摂取した場合、各植物エストロゲンは消化管内の微生物や肝臓によって代謝され、さらに多くの種類の植物エストロゲンに変換される。これらの植物エストロゲンがそれぞれ体内に吸収されるため、実際の生体では複数の植物エストロゲンが同時に存在していることになる。そこで、大豆飼料もしくは赤クローバーサイレージ摂取後の血中植物エストロゲン濃度を参考に、大豆モデル（パラエチルフェノール：ゲニステイン：エクオール = 5 μ M : 0.5 μ M : 0.5 μ M）および赤クローバーモデル（エクオール：ダイズイン：ホルモノネチン = 20 μ M : 2 μ M : 0.2 μ M）を調製し、生体同様に複数のイソフラボンが同時に存在する状況で

乳腺上皮細胞の増殖性と乳産生に及ぼす影響を調べた。その結果、大豆モデルでは細胞増殖性がわずかに上昇したが、赤クローバーモデルではエクオール 20 μ M 処理と同様に AKT の不活性化とともに細胞増殖性が低下していた。さらに、mTOR 量および pmTOR 量はダイズイン処理群では増加する傾向を示し、ホルモノネチン処理群では減少する傾向を示していたが、これらを含む赤クローバーモデルではコントロール群と同レベルを示した。したがって、植物エストロゲンが複数存在していた場合、その影響は個々の影響を反映する場合や相殺される場合があることが明らかになった。一方、大豆モデルと赤クローバーモデルの植物エストロゲン混合物において、乳産生とその調節転写因子に阻害的な影響は確認されなかった。そのため、泌乳期乳牛への従来通りの大豆飼料や赤クローバーサイレージの給与による植物エストロゲン摂取は、乳腺上皮細胞の乳産生能力に対してほとんど影響を及ぼしていないことが示唆された。しかし、乳牛のイソフラボン代謝能力と体内への吸収量はルーメン微生物やウシの健康状態によっても変化する。そのため、乳牛へのマメ科飼料の給与は、各個体の植物エストロゲン代謝能力を踏まえた上で行う必要があると考えられる。

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。