



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14384
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/96758
Type	doctoral thesis
File Information	Tsugami_Yusaku.pdf



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

北海道大学 大学院農学院

応用生物科学専攻 博士課程

津上 優作

目次

第一章 緒論	1
第二章 植物エストロゲンがマウス乳腺に及ぼす影響	8
1 序文	
2 結果	
2.1 マウス乳腺上皮細胞を用いた培養モデルの作製	
2.2 植物エストロゲンが乳腺上皮細胞の乳産生に及ぼす影響	
2.3 植物エストロゲンが乳腺上皮細胞の Blood-milk barrier に及ぼす影響	
2.4 植物エストロゲンが乳腺上皮細胞の乳産生を制御する転写因子に及ぼす影響	
2.5 生理的濃度の植物エストロゲンの長期処理が乳腺上皮細胞に及ぼす影響	
2.6 植物エストロゲンの腹腔内投与が泌乳期マウスの乳産生に及ぼす影響	
2.7 ゲニステインが乳腺上皮細胞の乳産生に及ぼす影響の作用機序	
3 考察	
第三章 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	53
1 序文	
2 結果	
2.1 ウシ乳腺上皮細胞の乳分泌モデル作製に向けた細胞の足場の検証	
2.2 Dex および BPE による乳産生能力の誘導効果	
2.3 Dex および BPE による強固な TJ 形成の誘導効果	
2.4 作製した乳分泌モデルの乳腺上皮細胞における細胞極性	
2.5 乳房炎起炎菌毒素が乳分泌モデルの乳産生に及ぼす影響	
2.6 乳房炎起炎菌毒素が乳分泌モデルの TLR シグナルおよび炎症性サイトカイン発現へ及ぼす影響	
2.7 炎症性サイトカインとケモカインが乳分泌モデルの乳産生に及ぼす影響	
2.8 LPS が乳分泌モデルにおける乳腺上皮細胞の膜タンパク質に及ぼす影響	
3 考察	

第四章 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	88
1 序文	
2 結果	
2.1 植物エストロゲンがウシ乳腺上皮細胞の増殖性および生存性に及ぼす影響	
2.2 植物エストロゲンが AKT-mTOR 経路および ERK1/2 経路に及ぼす影響	
2.3 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	
2.4 植物エストロゲンが STAT5 および STAT3 に及ぼす影響	
2.5 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その調節シグナル経路に及ぼす影響	
2.6 植物エストロゲン混合物がウシ乳腺上皮細胞の乳産生とその調節シグナル経路に及ぼす影響	
3 考察	
第五章 総括	106
第六章 材料と方法	109
1 実験動物	
2 試薬類	
3 マウス由来乳腺上皮細胞の培養に用いる増殖培地および分化培地の調製	
4 ウシ由来乳腺上皮細胞の培養に用いる増殖培地および分化培地の調製	
5 カバーガラスのコーティング処理	
6 コラーゲンゲルの調製	
7 マウスおよびウシ乳腺上皮細胞の単離	
8 マウス乳腺上皮細胞の培養	
9 ウシ乳腺上皮細胞の培養	
10 泌乳期マウスへの投与実験	
11 パラフィン切片および凍結切片の作製	
12 HE 染色	
13 免疫染色	
14 TUNEL 染色	
15 ウェスタンブロッティングのサンプル調製	

- 16 膜タンパク質のビオチン標識
- 17 Triton X-100 を用いた TJ タンパク質の分画
- 18 細胞質画分と核画分の分画
- 19 乳腺中に蓄積したカゼイン量の測定
- 20 ウェスタンブロッティング
- 21 RNA 抽出および cDNA への逆転写
- 22 定量 PCR
- 23 細胞増殖性試験および細胞生存性試験
- 24 経上皮電気抵抗値の測定
- 25 FITC 透過性の測定
- 26 細胞内および培地中トリグリセリド量の測定
- 27 培地中乳糖濃度の測定
- 28 統計解析

第七章 要約	129
第八章 謝辞	132
第九章 参考文献	133

第一章 緒論

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。現在、約 200 種類の植物エストロゲンが知られており、イソフラボン類、クメスタンス類、スチルベン類などに大別される (Dixon 2004; Michel et al. 2013; Soni et al. 2014)。これらの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 (Lookhart 1980; Mazur 1998; Andersen et al. 2009)。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 つの経路が存在する。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。例えば前者の場合、経口摂取したゲニステインは下部消化管やルーメンの微生物代謝によりパラエチルフェノールへ分解される (Batterham et al. 1965; Lundh 1995)。また、後者の経路では、ダイズインが微生物代謝によりエクオールに代謝変換される (Day et al. 1998)。さらに、消化管から吸収されたビオカニン A とホルモノネチンは門脈を介して肝臓に輸送され、肝臓で脱メチル化を受け、それぞれゲニステインとダイズインに代謝変換される (Lundh 1995)。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。

近年、植物エストロゲンの美容効果や健康増進効果が広く世間で注目されており、その作用機序も明らかになりつつある (Branca and Lorenzetti 2005)。例えば、植物エストロゲンはヒアルロン酸やコラーゲンなどの細胞外マトリックス量を増加させ、皮膚に対してアンチエイジング効果を示す (Gopaul et al. 2012; Thornton 2013)。また、植物エストロゲン

には、骨形成促進によって骨粗鬆症を予防する効果、一酸化窒素産生によって動脈硬化を予防する効果もある (Wuttke et al. 2002; Branca and Lorenzetti 2005; Gencel et al. 2012)。これらの生理作用は、植物エストロゲンがエストロゲン受容体 (ER) と結合し、下流の細胞内シグナル経路を調節することに起因すると考えられている (Mayr et al. 1992; Szkudelska and Nogowski 2007; Sirotkin and Harrath 2014)。ER を発現する細胞は中枢神経、生殖器官、消化器官、骨、肺、皮膚など生体を構成する組織のほとんどに存在し、内因性エストロゲンの調節を受けている細胞ほど植物エストロゲンに対する感受性も高い (Pelletier and El-Alfy 2000; Younes and Honma 2011; Bottner et al. 2014)。そして、乳腺上皮細胞は内因性エストロゲンに対する感受性が高い細胞の代表である。

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 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 (Lamote et al. 2004; Mallempe et al. 2006; Briskin and O'Malley 2010)。そして、エストロゲン活性を有する植物エストロゲンも乳腺組織の発達に影響を及ぼすことが知られている。例えば、ダイズインは乳腺上皮細胞の増殖を促進し、性成熟期の乳腺を過剰に発達させる (Mishra et al. 2011)。ゲニステインは乳腺上皮細胞の細胞周期を停止させ、乳腺胞構造への分化を促進する (Rahal and Simmen 2010)。また、クメストロールは細胞増殖を抑制し、アポトーシスを誘導する (Zafar et al. 2017)。ビオカニン A も細胞増殖と細胞死を乳腺の発達ステージ特異的に誘導する (Mishra et al. 2009)。以上のように、植物エストロゲンは、性成熟期と妊娠期における乳腺上皮細胞の形態形成に関与することが広く知られている。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 (Cerbulis

and Farrell 1975)。例えば、乳中に最も豊富に含まれる乳タンパク質であるカゼインには、 α -カゼイン、 β -カゼイン、 κ -カゼインといった性質の異なる複数のサブタイプが存在し、これらのサブタイプがゴルジ体でミセル構造を形成した後、開口分泌により頂端部細胞膜から内腔側へ分泌される (Stewart et al. 1987; Kumar et al. 1994)。また、ホエイタンパク質であるホエイ酸性タンパク質やラクトフェリン、乳脂肪球被膜タンパク質であるアディポフィリンやキサンチンオキシダーゼなども乳腺上皮細胞で産生され、頂端部細胞膜から分泌される (Nuijens et al. 1996)。乳特異的な二糖類である乳糖も乳腺上皮細胞内でグルコースと UDP-ガラクトースから合成される。グルコースはグルコーストランスポーターである GLUT1 により側底部細胞膜から乳腺上皮細胞内に取り込まれ、グルコースの一部は UGP2 などの酵素により UDP-ガラクトースへと変換される。続いて、 α -ラクトアルブミンと会合したガラクトシルトランスフェラーゼがグルコースと UDP-ガラクトースをゴルジ体で結合させ、乳糖が合成される。合成された乳糖は分泌小胞を介して頂端部細胞膜から分泌される (Ramakrishnan and Qasba 2001; Ramakrishnan et al. 2001; Rudolph et al. 2003; Mohammad et al. 2012)。乳腺上皮細胞が産生する乳脂質の大部分は、グリセロールと長鎖脂肪酸から構成されるトリグリセリドである。これらの長鎖脂肪酸は乳腺上皮細胞内で *de novo* 合成されるものと、脂肪酸トランスポーターである SLC27A3 や CD36 などにより側底部細胞膜から細胞内へ取り込まれるものがある (Stahl 2004)。細胞内の長鎖脂肪酸は FABP3 により小胞体へ輸送され、グリセロールと結合してトリグリセリドとなる。合成されたトリグリセリドは、アディポフィリンやキサンチンオキシダーゼなどが被覆した乳脂肪球として細胞質に放出される。乳脂肪球は細胞質内で他の乳脂肪球と融合し、拡大しながら頂端部細胞膜から分泌される (Rudolph et al. 2007; Rudolph et al. 2010)。以上のように、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腔内へ分泌している (Anderson et al. 2007; Truchet and Ollivier-Bousquet 2009) (図 1)。

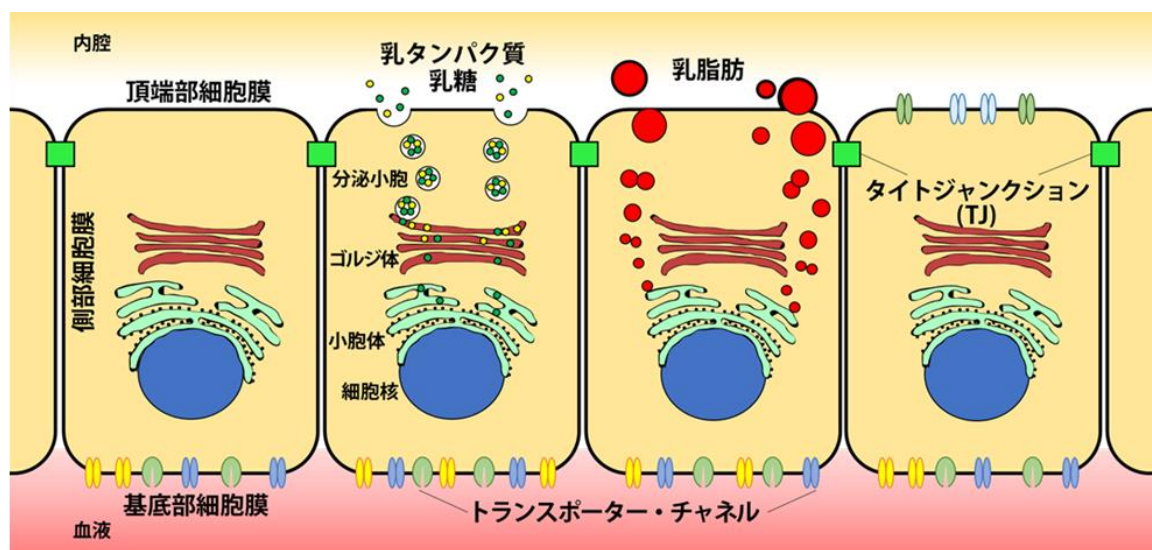


図1 泌乳期乳腺上皮細胞の特徴

泌乳期における乳腺上皮細胞の模式図を示す。乳腺上皮細胞は基部細胞膜に局在する輸送体から栄養素を取り込み、合成した乳成分を頂端部細胞膜から分泌するとともに、頭頂部側に透過性の低いタイトジャンクションを形成している。

上記のように、乳腺上皮細胞の乳産生は側底部細胞膜から頂端部細胞膜に向かって進行する。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 (Cereijido et al. 1998; Shin et al. 2006)。このように、乳成分と血液成分の障壁および膜タンパク質の仕切りとして機能する TJ は、膜貫通型タンパク質であるオクルディンやクローディンにより構成される。特に、クローディンは隣接する細胞と細胞の細胞膜表面に対となる TJ スtrand構造を形成し、この対となったstrand構造が細胞膜周囲を取り巻くことにより、水やイオンなどの小分子からタンパク質などの高分子まで細胞間隙を介した物質移動を制限している (Furuse et al. 1993; McCarthy et al. 1996; Tsukita and Furuse 2000a)。また、TJ スtrand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ている (Tsukita and Furuse 2000b)。これまで 63 種類のクローディンサブタイプが発見されており、乳腺においてはクローディン-1、-3、-4、-7 および-8が発現している (Mineta et al. 2011; Kolosov et al. 2013)。その中でも、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 (Kobayashi and Kumura 2011)。分娩前の妊娠期では、クローディン-3 とクローディン-4 はどちらも乳腺胞上皮細胞の TJ 領域と側底部細胞膜に局在し、弱い TJ バリアを形成している。しかし、泌乳期になるとクローディン-4 は TJ 領域にほとんど存在しなくなり、クローディン-3 が側底部細胞膜から乳腺胞 TJ 領域に局在変化して TJ スtrand構造の中心分子となり、オクルディンとともに透過性の低い強固な TJ を形成する (Blanchard et al. 2006; Kobayashi and Kumura 2011)。この泌乳期特異的な TJ は、Blood-milk barrierと言われる血液成分と乳成分の混合を防ぐ構造の中核を担っている。しかし、乳房炎発症時や離乳時には、クローディン-4 の発現量増加とともに、物質透過性の高い TJ

に変化し、さらに乳腺上皮細胞層の一部が細胞死によって脱落するため、乳腺上皮細胞の Blood-milk barrier は脆弱化する (Kobayashi et al. 2013; Uejyo et al. 2015)。

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 (Watson and Burdon 1996; Wyszomierski et al. 1999; Levy and Darnell 2002; Bertucci et al. 2010)。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 (PRLR) に結合することでヤヌスキナーゼ 2 (JAK2) 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 (Watson and Burdon 1996; Levy and Darnell 2002)。そのため、プロラクチン/STAT5 経路は、乳腺上皮細胞の乳産生能力を誘導するシグナル経路として認識されている。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 (Bertucci et al. 2010; Kobayashi et al. 2016b)。

植物エストロゲンは、マメ科植物や大豆食品など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 (Liu et al. 2005; Suzuki and Hara 2009; Noda et al. 2012; Piegholdt et al. 2014; Kiatprasert et al. 2015)。しかし、泌乳期における乳腺上皮細胞

胞の乳産生能力や Blood-milk barrier 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（第二章）。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 Blood-milk barrier を兼ね備えた *in vitro* 乳分泌モデルを確立した（第三章）。最後に、ウシ由来乳腺上皮細胞の *in vitro* 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泌乳牛の乳産生に及ぼす影響を分子・細胞レベルで調べた（第四章）。

第二章 植物エストロゲンがマウス乳腺に及ぼす影響

1 序文

植物エストロゲンは、大豆や赤クローバーなどのマメ科植物に含まれる生理活性物質として知られ、植物種によって含まれる植物エストロゲンの種類や量は異なる (Mazur 1998; Soni et al. 2014)。また、経口摂取された植物エストロゲンの一部は、消化管や肝臓で別の種類の植物エストロゲンへ代謝変換されるが、その植物エストロゲンの代謝変換能力には個体差がある (Lundh 1995)。そのため、同じマメ科植物を摂取した場合でも血液中に含まれる植物エストロゲンの種類や量は個体間で異なる (Watanabe et al. 1998; Zhao et al. 2006)。植物エストロゲンの血中濃度は、摂取後の時間や摂取頻度によっても変化する。例えば、大豆摂取直後からゲニステインおよびダイズインの血中濃度は上昇し、摂取 8–12 時間後においてそれぞれ 5 μM および 2 μM のピークに達する (Gardner et al. 2009)。また、継続してマメ科植物を摂取した場合、植物エストロゲンの血中濃度はより高い値を示す (Mathey et al. 2006)。したがって、マメ科植物摂取後の生体内には様々な植物エストロゲンが存在し、その種類や濃度は摂取後の時間、摂取頻度、個体間で多種多様に変化する。

植物エストロゲンは、種類依存的にエストロゲン受容体、ER との親和性を示す (Pfitscher et al. 2008; Pilsakova et al. 2010)。妊娠後期において、エストロゲンはプロゲステロンの分泌を促進し、乳腺上皮細胞の乳分泌を阻害する (Nishikawa et al. 1994)。泌乳期の乳腺上皮細胞においても ER は発現しており (LaPlante et al. 2017)、植物エストロゲンが ER を介して乳腺上皮細胞の乳産生に影響を及ぼすことが考えられる。また、植物エストロゲンには種類依存的な生理活性も存在する。例えば、ゲニステインは、上皮成長因子 (EGF) によるチロシンキナーゼ活性を阻害し (Akiyama et al. 1987; Manna 2012)、ホルモノネチンは線維芽細胞増殖因子受容体を阻害することが報告されている (Wu et al. 2015)。すなわち、植物エストロゲンは、種類別に異なる細胞内シグナル経路に作用し、細胞の性状

の調節に関与しているのである。

乳腺上皮細胞の乳産生能力と Blood-milk barrier は、プロラクチン/STAT5 経路やグルコシルコイド/GR 経路の活性化によって誘導される (Watson and Burdon 1996; Levy and Darnell 2002; Kobayashi et al. 2017)。一方、炎症時や離乳時には STAT3 経路が活性化することで乳腺上皮細胞の乳産生能力は低下する (Kobayashi et al. 2013; Uejyo et al. 2015)。これら細胞内シグナル経路の活性化/不活性化に応じて、乳腺上皮細胞の乳産生に関わる分子群の発現や機能が変化している。例えば、STAT5 経路と GR 経路が活性化している時、乳腺上皮細胞では、血液中からアミノ酸、グルコース、水・グリセロールを細胞内に取り込む輸送体である SLC7A5、GLUT1、AQP3 が側底部細胞膜に局在している (Matsuzaki et al. 2005; Yu et al. 2013; Lin et al. 2018)。また、細胞内で合成された乳成分は、頂端部細胞膜から乳腺胞内腔へ分泌される。さらに、GR 経路が活性化した乳腺上皮細胞は、乳成分が細胞間隙経路を介して血液成分と混合するのを防ぐため、透過性の低い TJ による Blood-milk barrier を形成する (Baumgartner et al. 2017)。一方、炎症や離乳により STAT3 経路が活性化すると、乳分泌における細胞極性は不明瞭になり、TJ バリア機能も低下する (Kobayashi et al. 2013; Uejyo et al. 2015)。

以上のことから、植物エストロゲンは、それぞれ異なる細胞内シグナル経路を活性化/不活性化して泌乳期における乳腺上皮細胞の乳産生能力や TJ バリアを調節している可能性がある。しかし、植物エストロゲンの影響を経口摂取で調べることは難しい。なぜなら、植物エストロゲンは体内で代謝変換され、その代謝能力には個体差もあるからである。そこで、本章ではまず、生体内での代謝変換の影響を考慮し、細胞培養モデルを用いて個々の植物エストロゲン処理を施し、乳腺上皮細胞の乳産生能力および Blood-milk barrier に及ぼす影響を種類別に評価した。続いて、その影響が生体レベルでも反映されるかを評価する実験では、消化管や肝臓での代謝変換を回避するため、泌乳期マウスの腹腔内へ植物エストロゲンを投与した。さらに、顕著な乳産生抑制作用を示したゲニステインに着目し、プロラクチン

の下流シグナルである STAT5 経路および EGF の下流シグナルである ERK1/2、p38、JNK 経路への影響を調べ、ゲニステインが乳腺上皮細胞へ及ぼす影響の作用機序の解明を試みた。

2 結果

2.1 マウス乳腺上皮細胞を用いた培養モデルの作製

各植物エストロゲンが泌乳期の乳腺上皮細胞に及ぼす影響を *in vitro* で調べるため、先行研究で確立されている培養モデルを作製した (Kobayashi et al. 2016a)。まず、非妊娠マウスの乳腺から乳腺上皮細胞塊を単離し、敷石状の乳腺上皮細胞層が形成されるまで培養した (図 2A–D)。続いて、プロラクチンおよびグルココルチコイド類似物であるデキサメタゾンを含む分化培地で培養し、乳腺上皮細胞の乳分泌能と強固な TJ 形成を誘導した。この培養モデルにおいて、乳腺上皮細胞が主要な乳タンパク質である β -カゼインを発現し、TJ タンパク質であるオクルディンとクローディン-3 が細胞間隙の TJ 領域に沿ってネットワーク状に共局在していることを確認し (図 2E、F)、本研究に供試した。

2.2 植物エストロゲンが乳腺上皮細胞の乳産生に及ぼす影響

図 2 の培養モデルを植物エストロゲン 25 μ M 存在下で 2 日間培養し、乳腺上皮細胞の形態に及ぼす影響を倒立型位相差顕微鏡で観察した (図 3)。なお、植物エストロゲンとして、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、大豆に含まれるゲニステインとダイズイン、アルファルファに含まれるクメストロール、およびこれらの最終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。また、エストロゲン活性のポジティブコントロールとしてエストラジオール処理も行った。未処理であるコントロール群では敷石状に配列した乳腺上皮細胞層が観察された。同様に配列した乳腺上皮細胞層は、エストラジオール処理群および各植物エストロゲン処理群でも観察され、コントロール群との形態的な違いは認められなかった。

続いて、植物エストロゲンが代表的な乳タンパク質である β -カゼインの細胞内量および培地中への分泌量に及ぼす影響を調べるため、植物エストロゲン存在下で 2 日間培養した後、乳腺上皮細胞層とその培地を回収し、ウェスタンブロッティングとそのバンドのデンシ

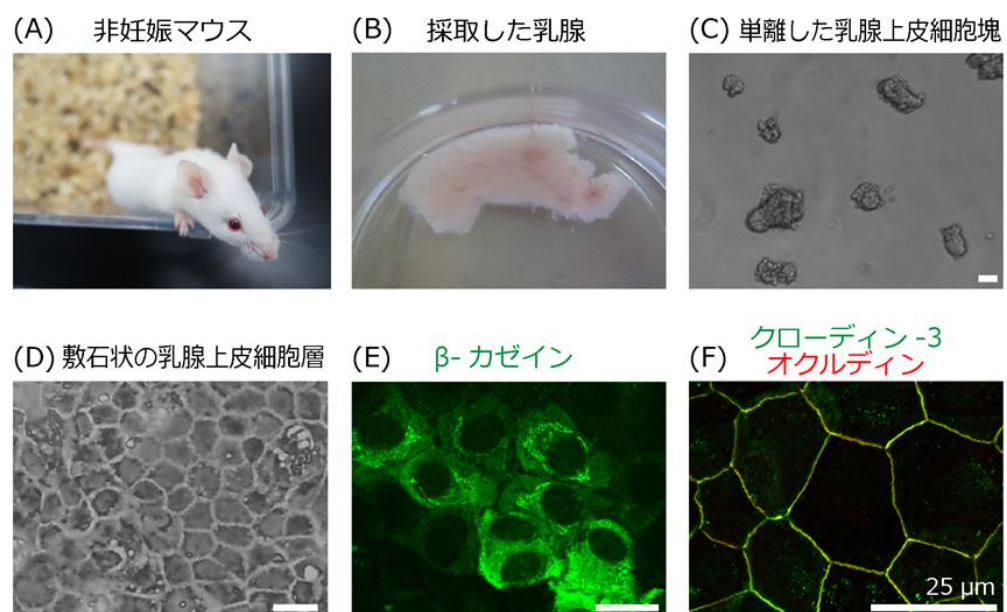


図2 マウス乳腺上皮細胞を用いた乳分泌モデルの作製

非妊娠マウス (A) から乳腺を採取し (B)、乳腺上皮細胞塊を単離した (C)。分化誘導培地で培養した乳腺上皮細胞層の位相差顕微鏡像 (D)、あるいはβ-カゼイン (E) とクロードイン-3/オクルディン (F) の免疫染色像を示す。スケールバーは25 μmを示す。

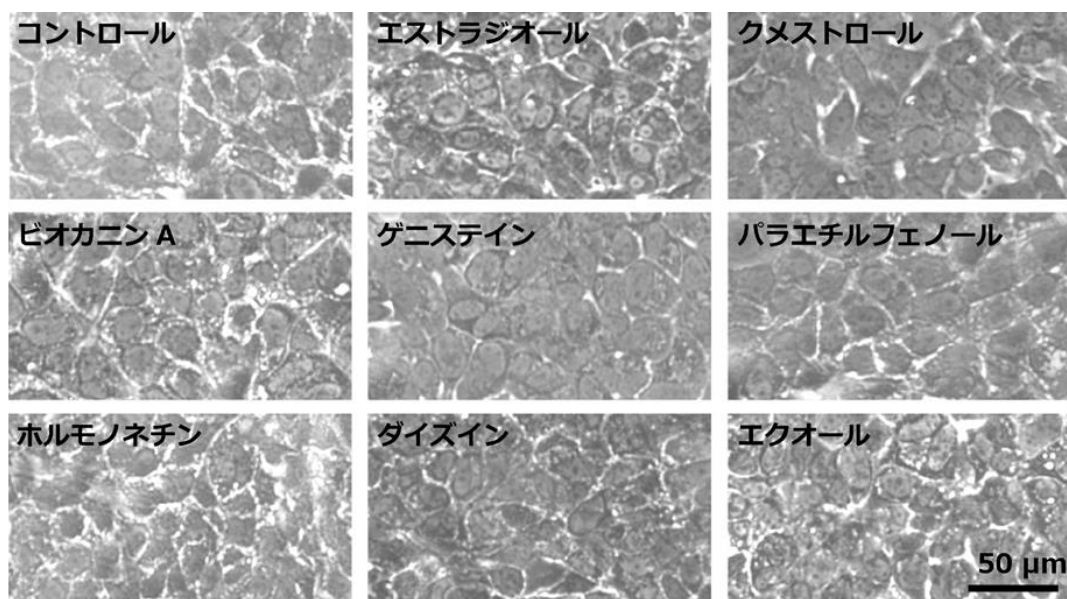


図3 エストラジオールおよび植物エストロゲンが乳腺上皮細胞の細胞形態へ及ぼす影響

エストラジオールもしくは植物エストロゲン25 μM存在下で2日間培養した乳腺上皮細胞の位相差顕微鏡像を示す。スケールバーは50 μmを示す。

トメトリ解析を行った (図 4)。エストラジオール 25 μ M 処理群では、細胞内および培地中の β -カゼイン量はコントロール群と比べてともに 4 割程度に減少しており、統計的な有意差も認められた (図 4A)。クメストロール 25 μ M 処理群では、細胞内 β -カゼイン量が 4 割、培地中 β -カゼイン量が 2 割程度に減少していた (図 4B)。ビオカニン A 25 μ M 処理群では、細胞内および培地中の β -カゼイン量はともにコントロール群の 6 割程度に減少していた (図 4C)。また、ゲニステイン 25 μ M 処理群では、細胞内 β -カゼイン量が 4 割、培地中 β -カゼイン量が 2 割程度に減少していた (図 4D)。ホルモノネチン 25 μ M 処理群でも、細胞内 β -カゼイン量が 8 割、培地中 β -カゼイン量が 6 割程度に減少していた (図 4F)。一方でパラエチルフェノール処理群、ダイズイン処理群およびエクオール処理群ではいずれの濃度においても β -カゼイン量の増減幅は小さく、コントロール群との間に統計的な有意差も認められなかった (図 4E、G、H)。

続いて、免疫染色により乳腺上皮細胞における β -カゼインの局在を調べた (図 5)。未処理のコントロール群では、 β -カゼイン陽性細胞が細胞層全体に均一に存在し、その細胞内ではゴルジ体マーカーである GM130 と同じ領域に β -カゼインが多く局在する様子が観察された。パラエチルフェノール処理群、ダイズイン処理群およびエクオール処理群でも同様の局在パターンが観察された。一方でエストラジオール処理群、クメストロール処理群、ビオカニン A 処理群およびゲニステイン処理群では、 β -カゼイン陰性の細胞が観察され、相対的に陽性細胞数が減少している様子であった。また、ゲニステイン処理群およびホルモノネチン処理群では、 β -カゼインがゴルジ体以外の領域で異常に凝集している細胞も観察された。クメストロール処理群では、細胞質全体に β -カゼインを多く含む細胞が観察された。

植物エストロゲンによる β -カゼイン産生への影響がタンパク質レベルで認められたため、各植物エストロゲン 25 μ M 存在下で 2 日間培養した乳腺上皮細胞における主要な乳タンパク質および乳糖と乳脂質の産生に関わる分子群の mRNA 発現量を定量 PCR により調べた (図 6)。

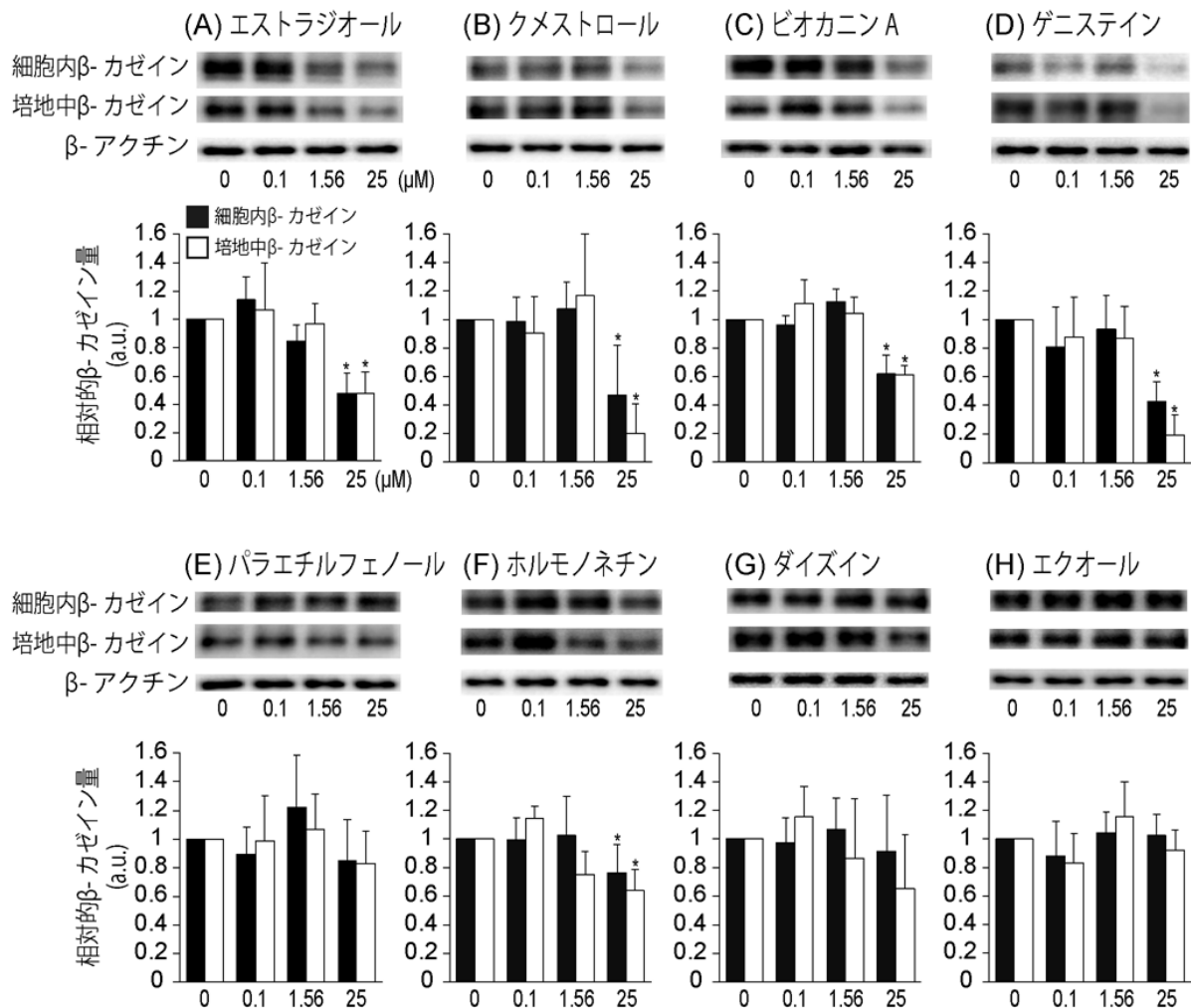


図4 エストラジオールおよび植物エストロゲンが乳腺上皮細胞の細胞内 β -カゼイン量および培地への分泌量に及ぼす影響

エストラジオール (A) もしくは植物エストロゲン (B-H) 0.1-25 μ M 存在下で2日間培養した乳腺上皮細胞における細胞内 β -カゼイン、培地中 β -カゼインおよび β -アクチンの代表的なウェスタンブロットング像を示す。グラフは検出したバンドをデンストメトリー解析し、 β -アクチンで標準化した β -カゼイン量 (黒: 細胞内、白: 培地中) を示す。縦軸は未添加処理であるコントロール群を基準とした相対的な値を示す。なお、エラーバーは標準偏差、*は $p < 0.05$ を示し、 $n = 4-8$ である。

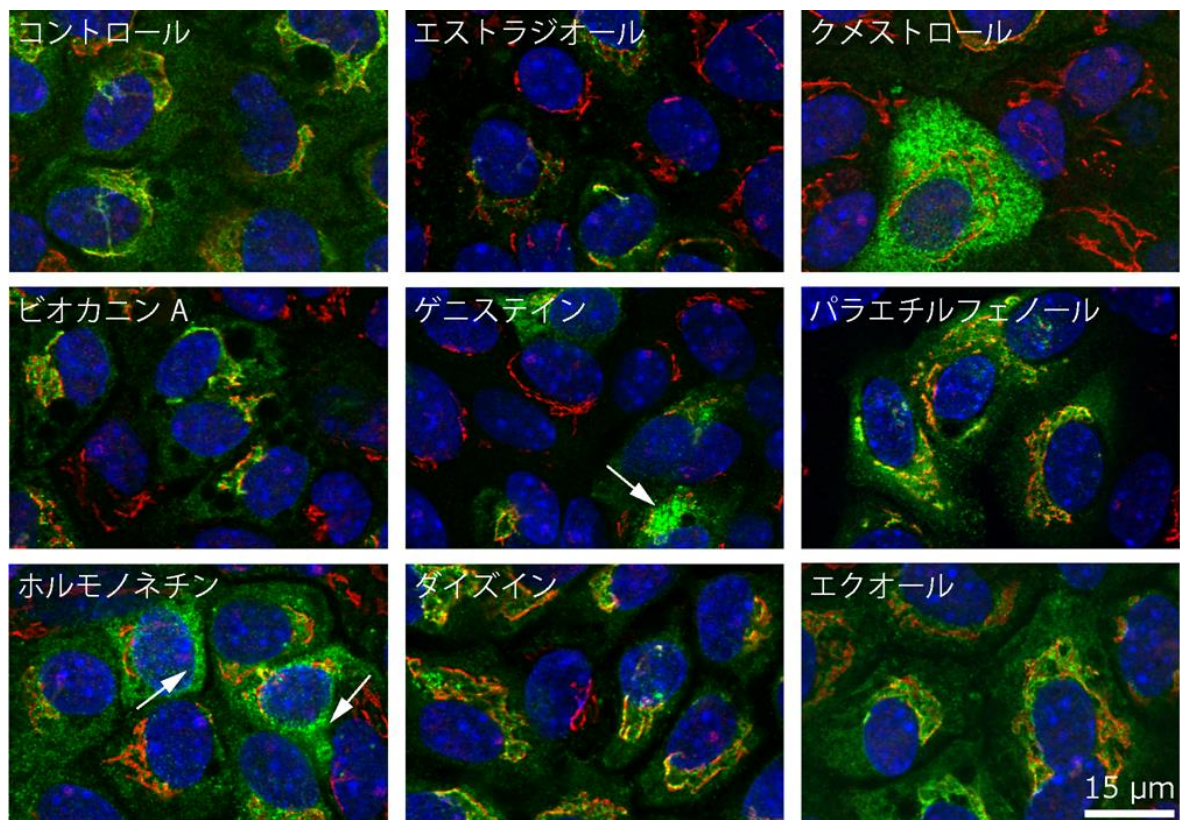


図5 エストラジオールおよび植物エストロゲンが乳腺上皮細胞のβ-カゼイン局在に及ぼす影響
 エストラジオールもしくは植物エストロゲン25 μM存在下で2日間培養した乳腺上皮細胞におけるβ-カゼイン(緑)の代表的な免疫染色像を示す。なお、赤はGM130(ゴルジ体マーカー)、青はDAPI(細胞核)であり、スケールバーは15 μmを示す。また、図中の矢印はβ-カゼインがGM130以外で異常に蓄積している部分を示す。

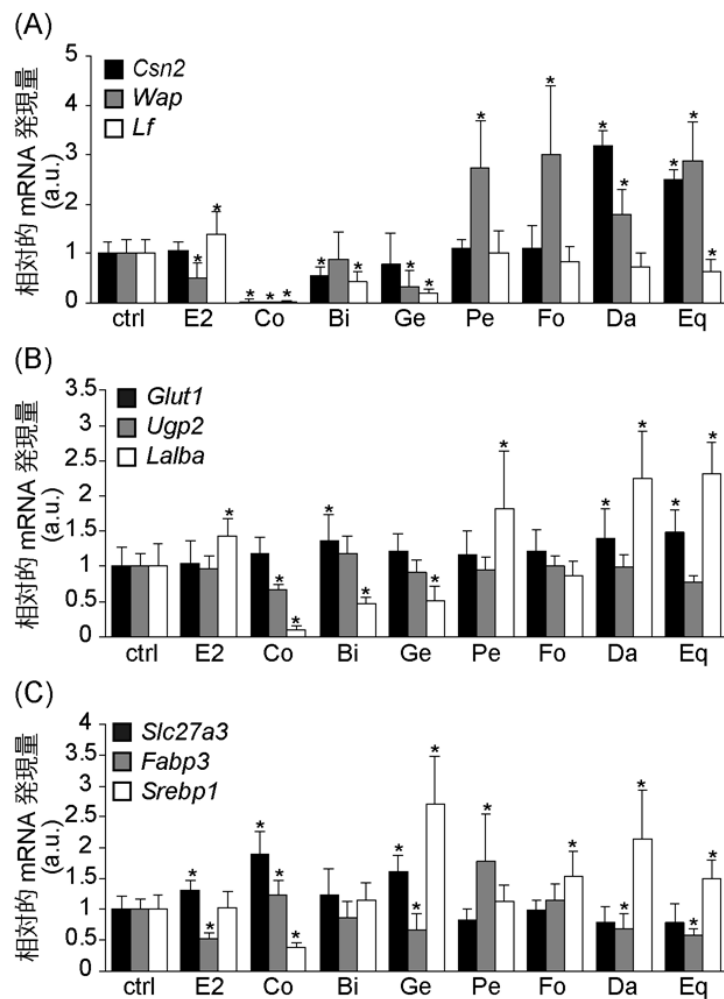


図6 エストラジオール (E2)および植物エストロゲンが乳腺上皮細胞の乳成分とその産生に関わる遺伝子群のmRNA発現量へ及ぼす影響

E2もしくは植物エストロゲン(クメストロール: Co, ビオカニンA: Bi, ゲニステイン: Ge, パラエチルフェノール: Pe, ホルモノネチン: Fo, ダイズイン: Da, エクオール: Eq) 25 μ M存在下で2日間培養した乳腺上皮細胞における乳タンパク質 (A)、あるいは乳糖 (B)と乳脂質 (C)の産生に関わる遺伝子群のmRNA発現量を示す。縦軸は未添加処理であるコントロール群を基準とした相対的な値を示す。なお、エラーバーは標準偏差、*は $p < 0.05$ を示し、 $n = 4-6$ である。

乳タンパク質として β -カゼイン (*Csn2*)、ホエイ酸性タンパク質 (*Wap*)、ラクトフェリン (*Lf*)について調べた結果、クメストロール処理群ではいずれも減少し、その割合はコントロール群の3%以下であった(図6A)。ビオカニンA処理群およびゲニステイン処理群でも各乳タンパク質の発現量は減少しており、特に *Lf*はコントロール群の半分以下であった。一方でパラエチルフェノール処理群、ホルモノネチン処理群、ダイズイン処理群およびエクオール処理群における *Wap* はコントロール群の1.8–3.0倍程に増加し、ダイズイン処理群とエクオール処理群では *Csn2* の発現量も2.5倍以上に増加していた。内因性のエストラジオール処理群では *Wap* が減少した一方で *Lf*が増加しており、いずれの植物エストロゲン処理群とも異なるパターンであった。以上の結果より、各植物エストロゲンは乳タンパク質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、ダイズインおよびエクオール)と抑制するグループ(クメストロール、ビオカニンAおよびゲニステイン)に大別された。

乳糖産生に関わる GLUT1、UGP2、 α -ラクトアルブミン (*Lalba*)の mRNA 発現量を調べた(図6B)。クメストロール処理群における *Lalba* は、コントロールの1%程に減少し、*Ugp2* も有意に減少していた。*Lalba* の発現量は、ビオカニンA処理群とゲニステイン処理群でもコントロール群の約半分に減少していた。一方でパラエチルフェノール処理群、ダイズイン処理群およびエクオール処理群では、*Lalba* はコントロール群の2倍程度に増加していた。また、ビオカニンA処理群、ダイズイン処理群およびエクオール処理群では、*Glut1* も増加していた。ホルモノネチン処理群ではいずれの遺伝子群もほとんど増減は見られなかった。エストラジオール処理群では *Lalba* は増加していたが、*Glut1* と *Ugp2* はコントロール群と同程度であった。

乳脂質産生に関わる SLC27A3、FABP3、SREBP1 の mRNA 発現量を調べた(図6C)。クメストロール処理群とゲニステイン処理群において、*Slc27a3* は増加していた。*Fabp3* はクメストロール処理群で増加し、ゲニステイン処理群で減少していた。*Srebp1* はクメスト

ロール処理群で減少し、ゲニステイン処理群で増加していた。一方、ホルモノネチン処理群、ダイズイン処理群およびエクオール処理群において *Srebp1* は増加し、ダイズイン処理群およびエクオール処理群において *Fabp3* は減少していた。パラエチルフェノール処理群では、*Fabp3* が有意に増加し、*Slc27a3* と *Srebp1* はコントロール群と同程度であった。エストラジオール処理群では、*Slc27a3* は増加し、*Fabp3* は半減していた。

2.3 植物エストロゲンが乳腺上皮細胞の Blood-milk barrier に及ぼす影響

泌乳期の乳腺胞では乳腺上皮細胞層とその細胞間隙をシールする TJ により Blood-milk barrier が形成される (Pitelka et al. 1973; Linzell and Peaker 1974)。TJ のバリア機能はその構成タンパク質であるクローディン組成により変化し、泌乳期の強固な TJ ではクローディン-3 が多く、離乳後や炎症時の TJ ではクローディン-4 が多くなる (Tsukita and Furuse 2000b; Kobayashi and Kumura 2011)。そこで各植物エストロゲンがクローディン-3 とクローディン-4 の発現に及ぼす影響をウェスタンブロッティングとそのバンドのデンストメトリー解析により調べた (図 7)。

クメストロール 25 μ M 処理群では、クローディン-4 の発現量がコントロール群の約 4 倍に増加していた (図 7A)。ビオカニン A 25 μ M 処理群においても、クローディン-4 の発現量が 1.4 倍に増加していた (図 7B)。一方でゲニステイン 25 μ M 処理群では、クローディン-3 の発現量が半減していた (図 7C)。また、ダイズイン 25 μ M 処理群およびエクオール 1.56 μ M 処理群ではクローディン-4 の発現量が、それぞれコントロール群の 6 割、8 割ほどに減少していた (図 7F、G)。なお、その他の植物エストロゲン処理群および処理濃度では顕著な影響は確認されなかった。

続いて、クローディン-3、-4 の局在を免疫染色により観察した (図 8)。コントロール群のオクルディンは細胞間隙をシールする TJ 領域に局在し、細胞層全体で連続的なネットワークとして観察された。クローディン-3 はオクルディンで示された TJ 領域に局在していた

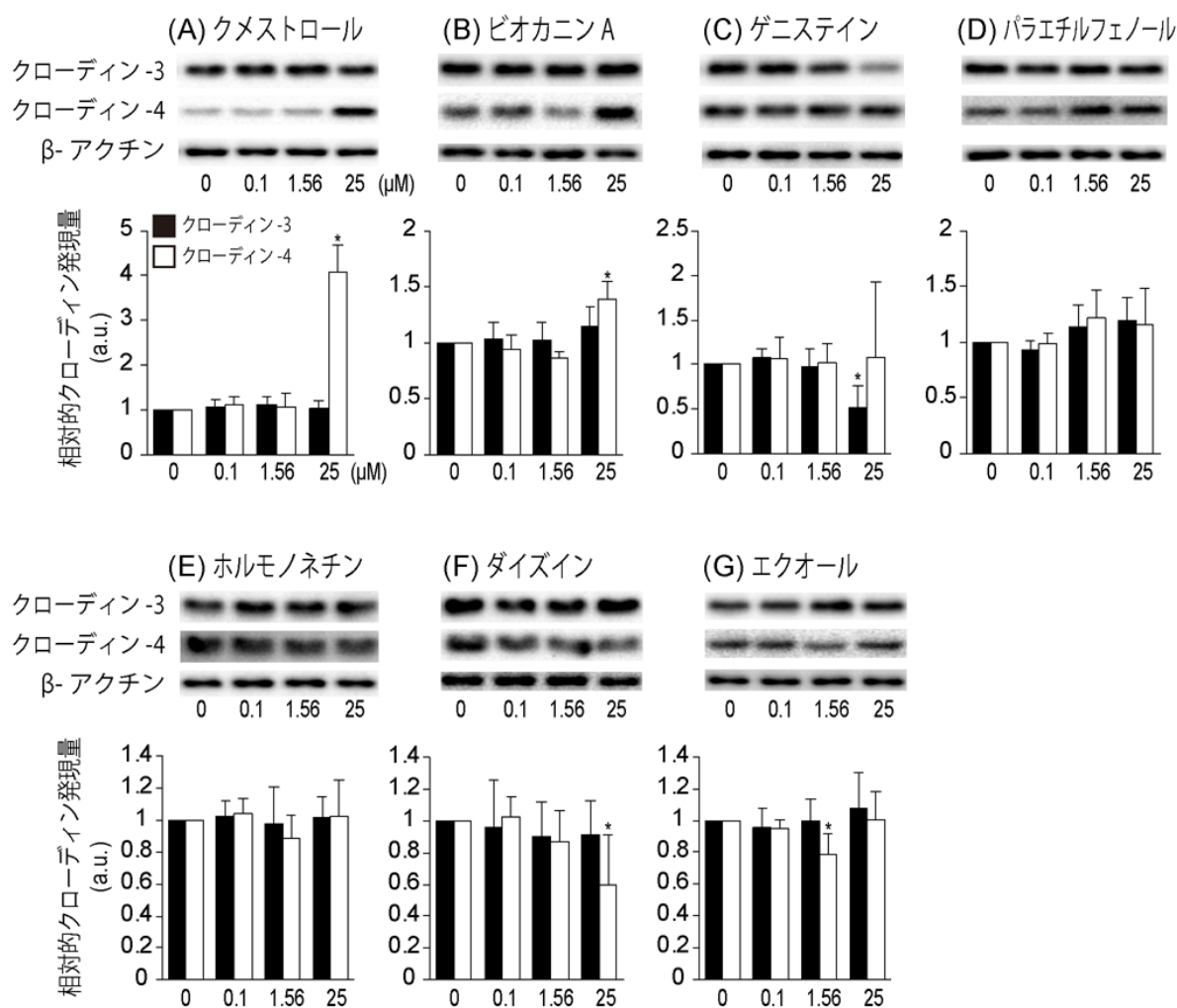


図7 植物エストロゲンが乳腺上皮細胞におけるクローデインの発現量に及ぼす影響

各植物エストロゲン (A-G) 存在下で2日間培養した乳腺上皮細胞におけるクローデイン-3、-4 およびβ-アクチンの代表的なウェスタンブロッティング像を示す。グラフは検出したバンドをデンシトメトリー解析し、β-アクチンで標準化したクローデイン量 (黒: クローデイン-3、白: クローデイン-4) を示す。縦軸は未添加処理であるコントロール群を基準とした相対的な値を示す。なお、エラーバーは標準偏差、*は $p < 0.05$ を示し、 $n = 4-8$ である。

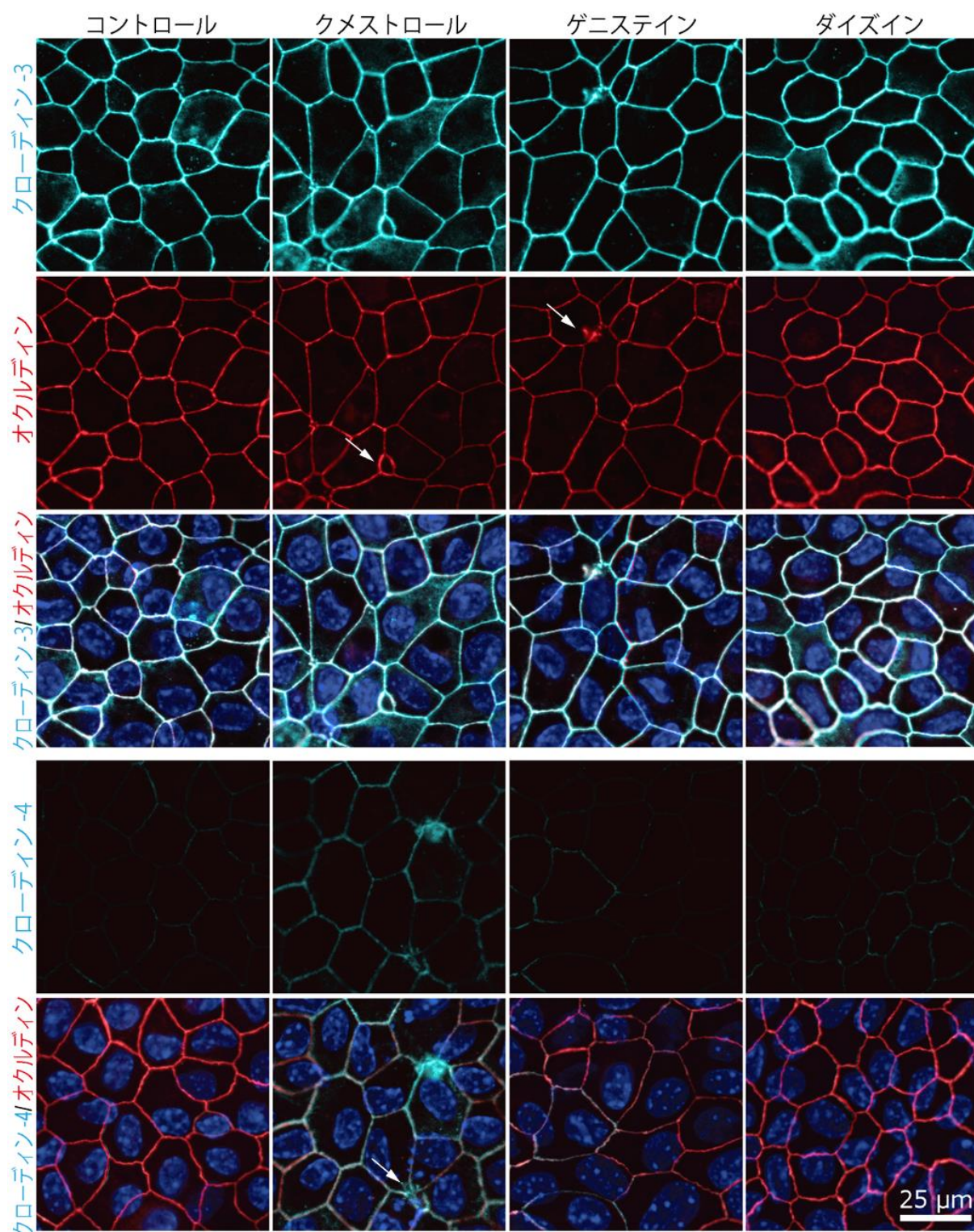


図8 植物エストロゲンが乳腺上皮細胞におけるTJ構成タンパク質の局在に及ぼす影響

セルカルチャーインサート上で培養し、植物エストロゲン25 μMで2日間処理した乳腺上皮細胞におけるTJ構成タンパク質の代表的な免疫染色像を示す。シアンはクロードイン-3もしくはクロードイン-4を示し、赤はオクルディン (TJマーカー)、青はDAPI (細胞核) である。なお、スケールバーは25 μmを示す。図中の矢印は細胞が欠損した穴やTJネットワークが不連続な部分を示す。

が、クロードイン-4 の陽性反応は弱く、ほとんど観察されなかった。ダイズイン処理群においてもコントロール群と同様の局在パターンが観察された。一方、クメストロール処理群およびゲニステイン処理群では細胞層の一部で細胞が欠損した穴や TJ ネットワークが不連続な部分も観察された。さらに、クメストロール処理群ではクロードイン-4 の強い染色が一部の TJ 領域で観察された。

クロードインの免疫染色において乳腺上皮細胞層の一部が欠損している様子が観察された。そこで、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色により乳腺上皮細胞層を観察したところ、クメストロール処理群およびゲニステイン処理群において細胞が欠損した部分が確認された (図 9A)。そこで、この欠損が植物エストロゲンによる細胞死誘導に起因しているかについて調べた。まず、アポトーシスのエフェクターカスパーゼであるカスパーゼ-3 の活性化をウェスタンブロッティングによって調べた (図 9B)。その結果、すべての群で不活性なカスパーゼ-3 が検出されたが、クメストロール処理群においてのみ活性型カスパーゼ-3 のバンドが明瞭に確認された。続いて、免疫染色により活性型カスパーゼ-3 の局在パターンを観察した (図 9C)。コントロール群では、活性型カスパーゼ-3 陽性の細胞が一部で観察されたが、大部分の細胞は陰性であった。ダイズイン処理群においてもコントロール群と同様の局在パターンが観察された。一方でクメストロール処理群およびゲニステイン処理群ではコントロール群と比べ、活性型カスパーゼ-3 に対して強い陽性を示す細胞が散在している様子が観察された。さらに、アポトーシス促進因子である Bax、アポトーシス抑制因子である Bcl2 の発現量への影響をウェスタンブロッティングおよびそのバンドのデンストメトリ解析により調べた (図 9D)。クメストロール処理群では Bax の発現量がコントロール群の 4 割程度に減少していた。Bcl2 も 7 割程度に減少していたが、統計的な有意差は認められなかった。また、ゲニステイン処理群では Bax が 7 割程度に減少し、ダイズイン処理群でも Bax と Bcl2 が 9 割程度に減少していたが、コントロール群との間に統計的な有意差は認められなかった。

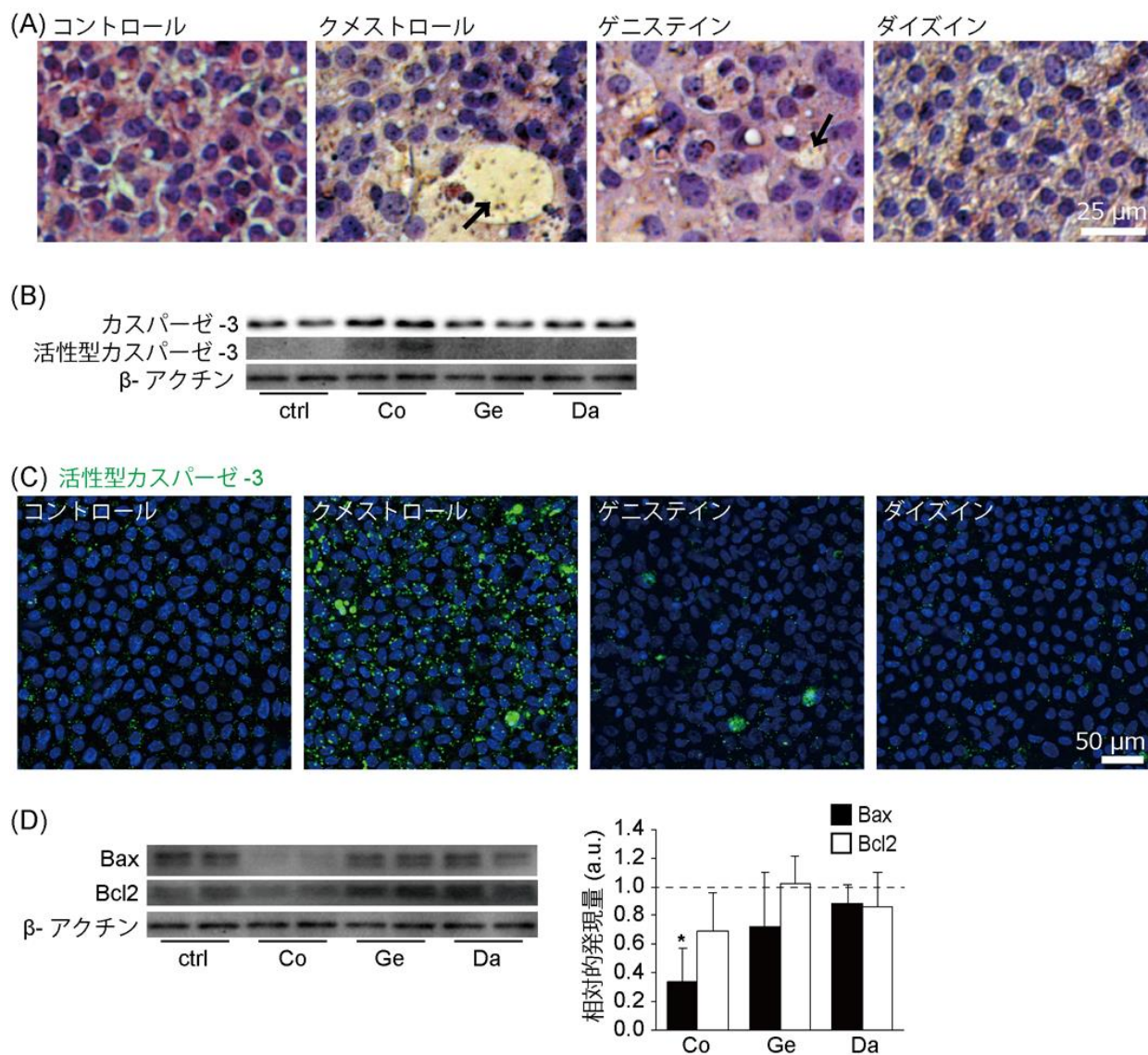


図9 植物エストロゲンが乳腺上皮細胞のアポトーシスに及ぼす影響

セルカルチャーインサート上で培養し、植物エストロゲン(クメストロール: Co, ゲニステイン: Ge, ダイズイン: Da) 25 μMで2日間処理した乳腺上皮細胞のアポトーシスへの影響を示す。(A) 代表的なHE染色像を示す。なお、スケールバーは25 μmを示し、図中の矢印は乳腺上皮細胞が剥離した部分を示す。(B) カスパーゼ-3、活性型カスパーゼ-3およびβ-アクトリンの代表的なウェスタンブロットティング像を示す。(C) 活性型カスパーゼ-3 (緑)の代表的な免疫染色像を示す。青はDAPI (細胞核)を示し、スケールバーは50 μmである。(D) Bax、Bcl2およびβ-アクトリンの代表的なウェスタンブロットティング像を示す。グラフは検出したバンドをデンストメトリー解析し、β-アクトリンで標準化したものを示す。なお、グラフの縦軸は未添加処理であるコントロール群を基準とした相対的な値を示す。エラーバーは標準偏差、*は $p < 0.05$ を示し、 $n = 4$ である。

各植物エストロゲン存在下で培養した乳腺上皮細胞層のバリア機能を経上皮電気抵抗値およびフルオレセインイソチオシアネート (FITC)透過性により評価した (図 10)。植物エストロゲン処理直後の経上皮電気抵抗値を基準とし、12 時間おきに測定した結果、コントロール群では 12 時間後には 1.06 倍、48 時間後には 1.15 倍へ上昇していた (図 10A)。クメストロール処理群では 12 時間後には 0.9 倍になり、その後も徐々に減少して、48 時間後には処理直前の 0.58 倍まで減少していた。ゲニステイン処理群でも 12 時間後には 0.8 倍となり、48 時間後には 0.58 倍であった。ダイズイン処理群では 12 時間後までは処理直前と同じレベルの抵抗値を維持していたが、その後、徐々に減少し、48 時間後には 0.64 倍であった。また、FITC 透過性はクメストロール処理群およびゲニステイン処理群でコントロール群の 2.5 倍以上に増加し、ダイズイン処理群は約 1.4 倍に増加していた (図 10B)。

2.4 植物エストロゲンが乳腺上皮細胞の乳産生を制御する転写因子に及ぼす影響

STAT5 は乳産生を上方調節する代表的な転写因子であり、プロラクチンと PRLR の結合刺激によってリン酸化し、転写因子として活性化する (Watson and Burdon 1996; Levy and Darnell 2002)。そこで、各植物エストロゲンがプロラクチン/STAT5 経路に及ぼす影響を調べた (図 11)。

まず定量 PCR により PRLR (short form、long form)および STAT5 の mRNA 発現量を調べた (図 11A)。なお、2 種類ある PRLR のうち、long form が泌乳期特異的に増加し、乳タンパク質の合成を調節することが報告されている (Lesueur et al. 1991)。クメストロール処理群では、*Prlr short form* の発現量がコントロール群の 2 割程度、*Prlr long form* の発現量が 6 割程度、*Stat5* の発現量が 4 割程度まで減少していた。ゲニステイン処理群でもそれぞれの発現量が 5–6 割程度に減少していた。一方、ビオカニン A 処理群、ホルモノネチン処理群、ダイズイン処理群およびエクオール処理群では *Prlr short form* の発現量が 1.2 倍程度に増加していた。また、ホルモノネチン処理群では *Prlr long form* の発現量が増加

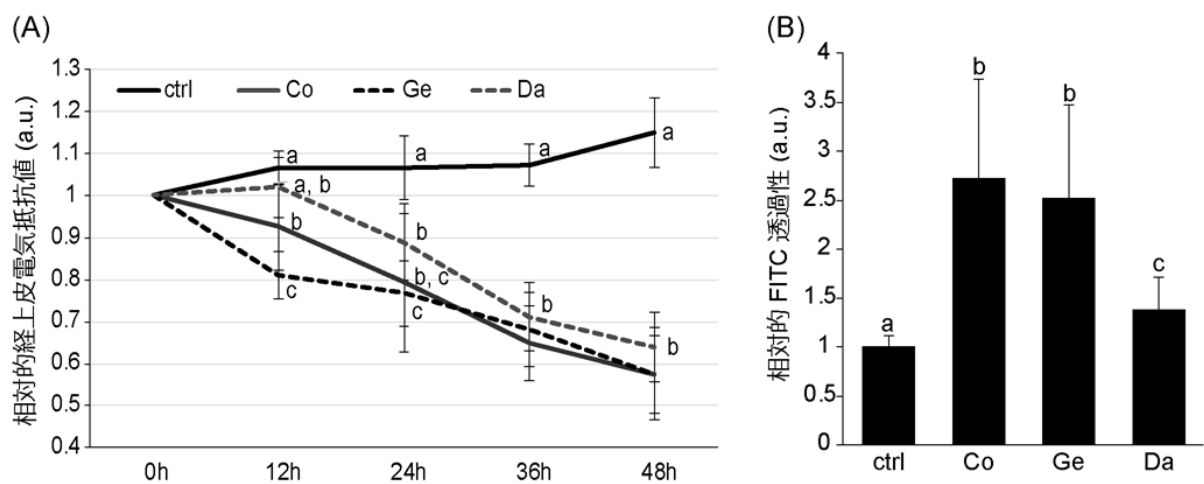


図10 植物エストロゲンが乳腺上皮細胞のTJバリア機能に及ぼす影響

セルカルチャーインサート上で培養し、植物エストロゲン(クメストロール: Co, ゲニステイン: Ge, ダイズイン: Da) 25 μ M存在下で2日間培養した乳腺上皮細胞における経上皮電気抵抗値の経時的な変化 (A)および処理2日後のFITC透過性を示す (B)。グラフの縦軸は各群0hを基準とした相対値 (A)あるいは未添加処理であるコントロール群を基準とした相対的な値を示す (B)。なお、エラーバーは標準偏差を示し、n=4、異符号間で有意差あり ($p < 0.05$)。

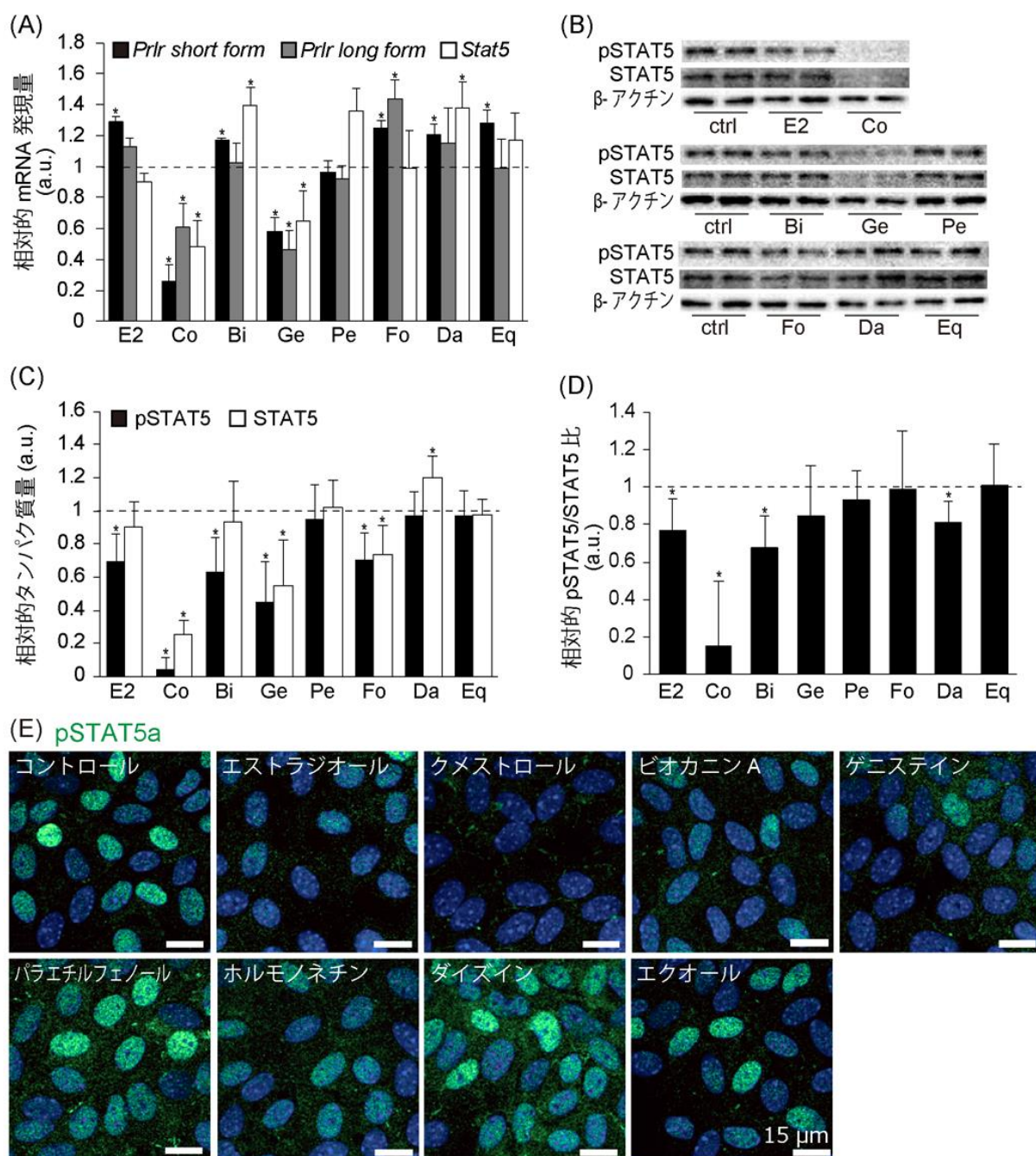


図11 エストラジオール (E2)および植物エストロゲンが乳腺上皮細胞のプロラクチン/STAT5経路に及ぼす影響

E2もしくは植物エストロゲン (クメストロール: Co, ビオカニンA: Bi, ゲニステイン: Ge, パラエチルフェノール: Pe, ホルモノネチン: Fo, ダイズイン: Da, エクオール: Eq) 25 μ M存在下で2日間培養した乳腺上皮細胞のプロラクチン/STAT5経路への影響を示す。(A) グラフは *Prlr* (黒: *short form*, 灰: *long form*) および *Stat5* (白) のmRNA発現量を示す。(B) pSTAT5、STAT5および β -アクチンの代表的なウェスタンブロッティング像を示す。(C) グラフは検出したバンドをデンストメトリー解析し、 β -アクチンで標準化したpSTAT5量 (黒) およびSTAT5量 (白) を示す。(D) グラフは検出したバンドのpSTAT5/STAT5比を示す。(E) pSTAT5a (緑) の代表的な免疫染色像を示す。青はDAPI (細胞核) を示し、スケールバーは15 μ mである。なお、グラフの縦軸は未添加処理であるコントロール群を基準とした相対的な値を示す。また、エラーバーは標準偏差、*はp < 0.05を示し、n = 4-8である。

し、ビオカニン A 処理群およびダイズイン処理群では *Stat5* の発現量が増加していた。なお、エストラジオール処理群では *Prlr short form* の発現量が 1.3 倍に増加していたが、*Prlr long form* や *STAT5* の発現量はほとんど変化が見られなかった。

続いて、各植物エストロゲンが *STAT5* 量とその活性型であるリン酸化 *STAT5* (p*STAT5*) 量に及ぼす影響をウェスタンブロッティングとそのバンドのデンストメトリー解析により調べた (図 11B、C)。クメストロール処理群では *STAT5* 量がコントロール群の 3 割程度に減少し、p*STAT5* 量が 1 割以下に減少していた。また、クメストロール群では、p*STAT5*/*STAT5* の比率も低下していた (図 11D)。ビオカニン A 処理群では p*STAT5* 量が 6 割程度に減少し、p*STAT5*/*STAT5* の比率も 7 割程度に低下していた。ゲニステイン処理群では *STAT5* 量と p*STAT5* 量が同程度で減少しており、それぞれコントロール群の 5 割程度であった。ホルモノネチン処理群でも同様に減少しており、コントロール群の 7 割程度であった。p*STAT5*/*STAT5* の比率は、ゲニステイン処理群では 9 割程度に低下していたが有意差は認められず、ホルモノネチン処理群でもコントロール群と比べてほとんど変化していなかった。ダイズイン処理群では *STAT5* 量が 1.2 倍に増加し、p*STAT5*/*STAT5* の比率が 8 割程度に低下していた。エクオール処理群ではいずれもコントロール群と比べて変化していなかった。なお、エストラジオール処理群では p*STAT5* 量がコントロール群の 7 割程度に減少し、p*STAT5*/*STAT5* の比率も 8 割以下に低下していた。

活性化した *STAT5* は転写因子として細胞質から核内へ移行することから、免疫染色により p*STAT5a* の細胞内局在を調べた (図 11E)。コントロール群では染色性に強弱の違いはあったが、ほとんどの乳腺上皮細胞で p*STAT5a* が核内に局在していた。パラエチルフェノール処理群、ダイズイン処理群およびエクオール処理群においてもほとんどの細胞が p*STAT5a* 陽性の細胞核を示した。一方でビオカニン A、ホルモノネチン、クメストロール、ゲニステインおよびエストラジオールで処理した細胞層では p*STAT5a* 陽性細胞が少なく、核内の染色性も低下していた。

続いて、プロラクチン/STAT5 経路とともに乳産生を制御することが知られているグルココルチコイド/GR 経路について調べた (Kobayashi et al. 2017) (図 12)。ウェスタンブロッティングとそのバンドのデンストメトリー解析の結果、クメストロール処理群では、GR 量がコントロール群の 6 割程度に有意に減少していた。また、ビオカニン A 処理群およびゲニステイン処理群においても GR 量が減少しており、それぞれ、コントロール群の 7 割、8 割程度であった。一方でパラエチルフェノール処理群、ホルモノネチン処理群およびダイズイン処理群では GR 量が 1.2 倍程度に増加していた。なお、エストラジオール処理群およびエクオール処理群でもわずかに増加していたが、統計的な有意差は認められなかった。

2.5 生理的濃度の植物エストロゲンの長期処理が乳腺上皮細胞に及ぼす影響

これまでの結果より、高濃度 (25 μ M)、短期間 (2 日間)処理の植物エストロゲンが乳腺上皮細胞の乳産生能力に影響を及ぼすことが明らかになった。続いて、マメ科植物由来食品を毎日適度に摂取する場合を想定し、乳腺上皮細胞を生理的濃度 (1、5 μ M)の植物エストロゲン存在下で 7 日間培養し、 β -カゼイン産生に及ぼす影響について調べた (図 13)。また、乳産生を上方調節する STAT5 経路、下方調節する STAT3 経路、EGF によって活性化する EGF 受容体 (EGFR)経路、およびエストロゲンによって活性化する ER 経路についても調べた。

ゲニステイン 1 μ M 処理群では、細胞内 β -カゼイン量がコントロール群の約 1.4 倍に増加し、ゲニステイン 5 μ M 処理群では培地中 β -カゼイン量が 7 割程度に減少していた (図 13A)。また、ゲニステイン 1 μ M 処理群では pSTAT5 量および STAT5 量が 1.2 倍に増加し、STAT3 量が 9 割程度に減少していた。一方、ゲニステイン 5 μ M 処理群では pSTAT5 量および STAT5 量が 7 割程度に減少し、pSTAT3 量および STAT3 量が半分程度に減少していた。さらに、pERK1/2 量が 7 割程度、ERK1/2 量が 8 割程度に減少し、pER α 量および ER α 量が 6 割程度に減少していた。ダイズイン処理群では、いずれの処理濃度においても統計的

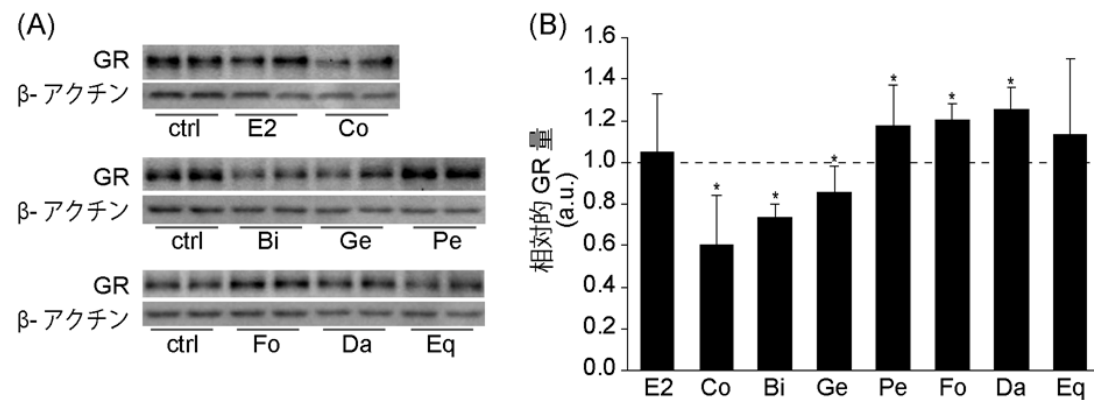


図12 エストラジオール (E2)および植物エストロゲンが乳腺上皮細胞のGR量に及ぼす影響

(A) E2もしくは植物エストロゲン(クメストロール: Co, ビオカニンA: Bi, ゲニステイン: Ge, パラエチルフェノール: Pe, ホルモノネチン: Fo, ダイズイン: Da, エクオール: Eq) 25 μ M存在下で2日間培養した乳腺上皮細胞におけるGRおよび β -アクチンの代表的なウェスタンブロットティング像を示す。(B) 検出したバンドをデンストメトリー解析し、 β -アクチンで標準化したGR量を示す。縦軸は未添加処理であるコントロール群を基準とした相対的な値を示す。なお、エラーバーは標準偏差、*は $p < 0.05$ を示し、 $n = 6$ である。

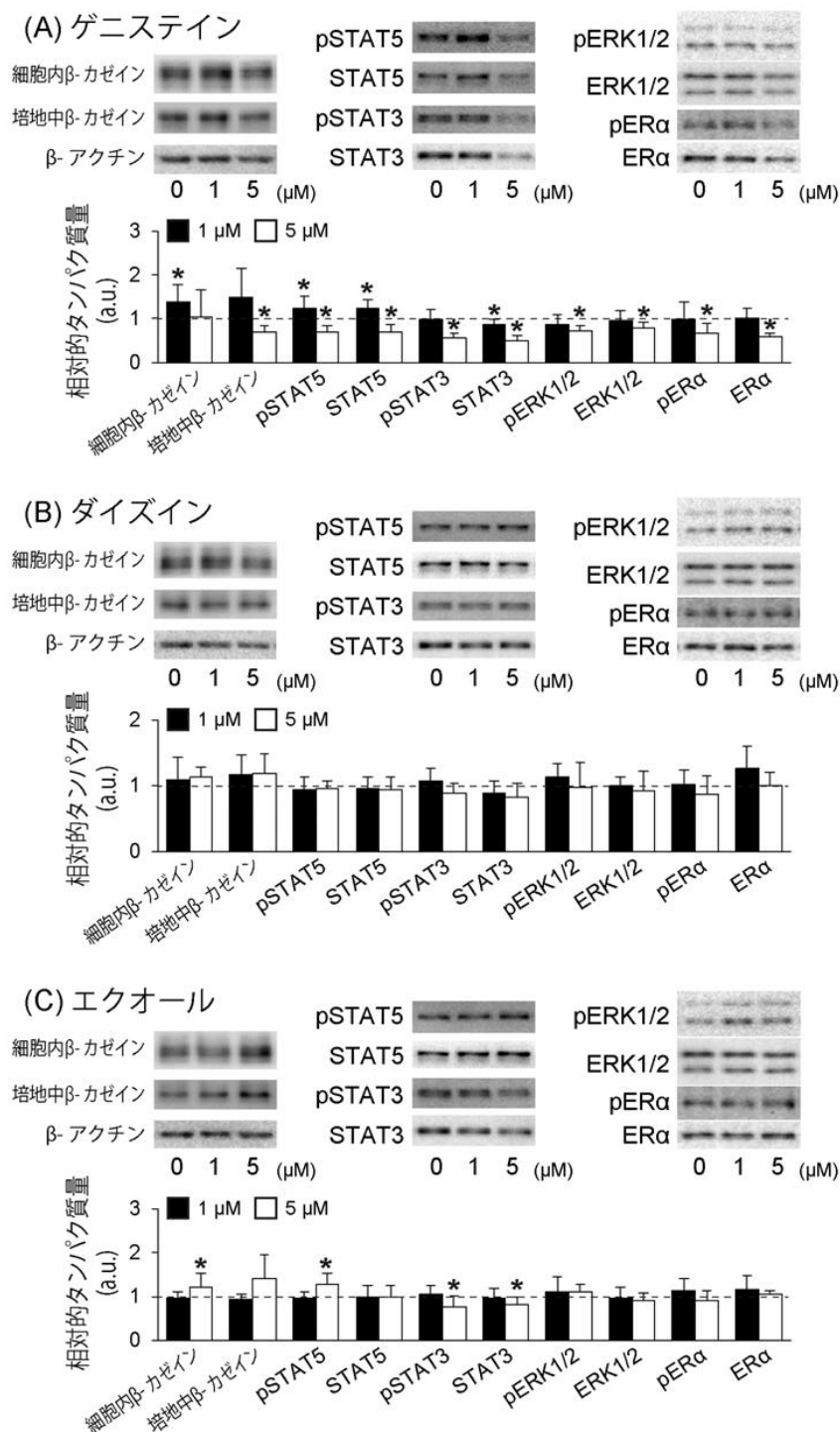


図13 生理的濃度の植物エストロゲンの長期処理が乳腺上皮細胞のβ-カゼイン産生および細胞内シグナル経路に及ぼす影響

ゲニステイン (A)、ダイズイン (B) もしくはエクオール (C) 1、5 μM 存在下で7日間培養した乳腺上皮細胞における各タンパク質の代表的なウェスタンブロットング像を示す。グラフは検出したバンドをデンストメトリー解析し、β-アクチンで標準化したタンパク質量 (黒: 1 μM、白: 5 μM) を示す。縦軸は未添加処理であるコントロール群を基準とした相対的な値を示す。なお、エラーバーは標準偏差、*は $p < 0.05$ を示し、 $n = 6-8$ である。

に有意な変化は確認されなかった (図 13B)。エクオール 5 μ M 処理群では細胞内 β -カゼイン量が 1.2 倍に増加し、pSTAT5 量が 1.3 倍に増加していた (図 13C)。一方、pSTAT3 量と STAT3 量が 8 割程度に減少していた。また、エクオール 1 μ M 処理群においては、統計的に有意な変化は確認されなかった。

2.6 植物エストロゲンの腹腔内投与が泌乳期マウスの乳産生に及ぼす影響

植物エストロゲンが乳産生に及ぼす影響を生体レベルで検証するため、ゲニステイン、ダイズインおよびエクオールを 1 μ g/g (body weight)/日で泌乳期マウスに 5 日間腹腔内投与し、最終投与の 24 時間後に乳腺を採取した。採取した乳腺はいずれの投与群においても鬱血や乳汁の過剰蓄積などの異常は外観では確認されなかった (図 14A)。また、HE 染色および TUNEL 染色を行ったところ、いずれの投与群においても乳腺胞構造の崩壊や異常な細胞死も検出されなかった。母マウスおよび仔マウスの体重においてもコントロール群と比べて統計的な有意差は確認されなかった (図 14B)。

まず、乳タンパク質の mRNA 発現量に及ぼす影響について定量 PCR を用いて調べた (図 15A)。ゲニステイン投与群では、 α -カゼイン (*Csn1*)、 κ -カゼイン (*Csn3*)およびホエイ酸性タンパク質 (*Wap*)の mRNA 発現量がコントロール群の半分以下に減少し、 β -カゼイン (*Csn2*)の mRNA 発現量もコントロール群の 6 割程度に減少していた。ダイズイン投与群では、いずれの mRNA 発現量もコントロール群の 8 割程度に減少していたが、統計的な有意差は確認されなかった。一方、エクオール投与群では、*Csn1* がコントロール群の約 1.4 倍、*Csn2* および *Csn3* が約 1.6 倍に増加していた。また、*Wap* も約 1.3 倍に増加していたが、統計的な有意差は確認されなかった。続いて、乳中の α -カゼイン量および β -カゼイン量をウェスタンブロッティングとそのバンドのデンストメトリー解析により調べた (図 15B)。ゲニステイン投与群では、 α -カゼイン量がコントロール群の 7 割程度に減少し、 β -カゼイン量が 8 割程度に減少していた。一方、ダイズイン投与群およびエクオール投与群

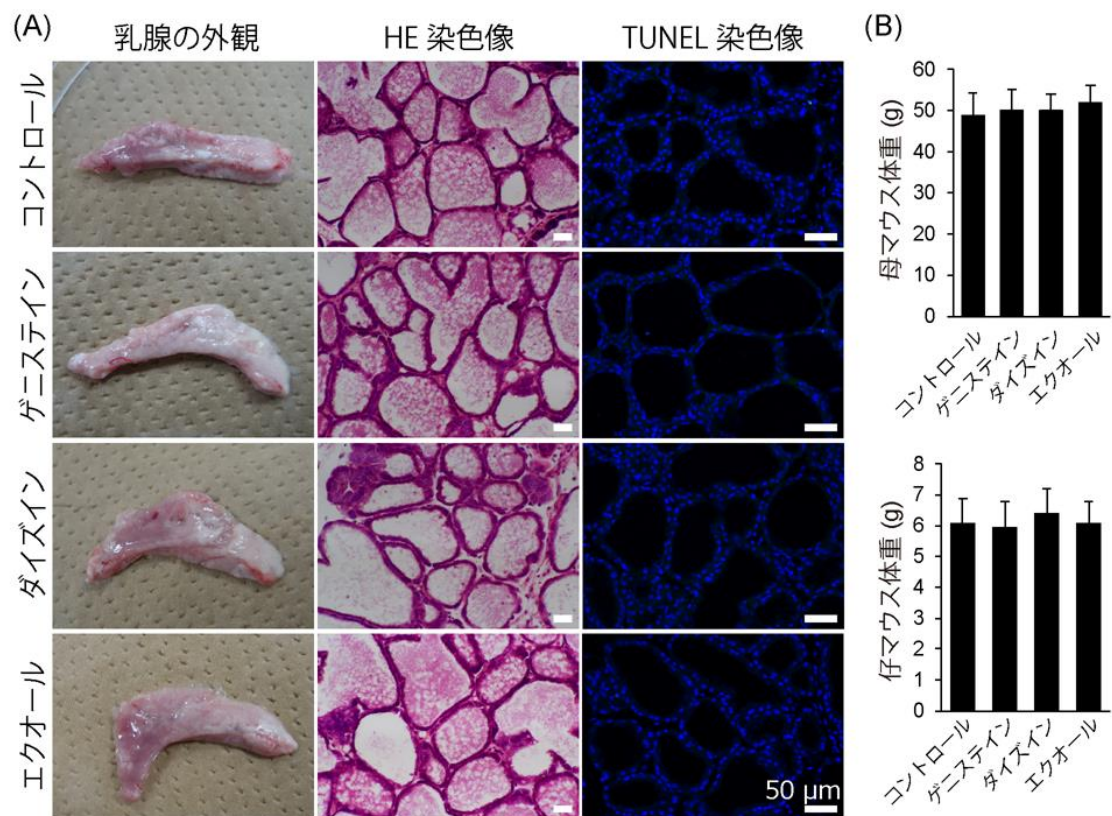


図14 植物エストロゲンの腹腔内投与が乳腺の形態および母仔マウスの体重変化に及ぼす影響
 (A) ゲニステイン、ダイズイン、エクオールを腹腔内投与した泌乳期マウスにおける乳腺の外観、HE染色像およびTUNEL染色像を示す。スケールバーは50 μ mを示す。(B) グラフは投与終了後の母マウスおよび仔マウスの体重を示す。エラーバーは標準偏差、n=6である。

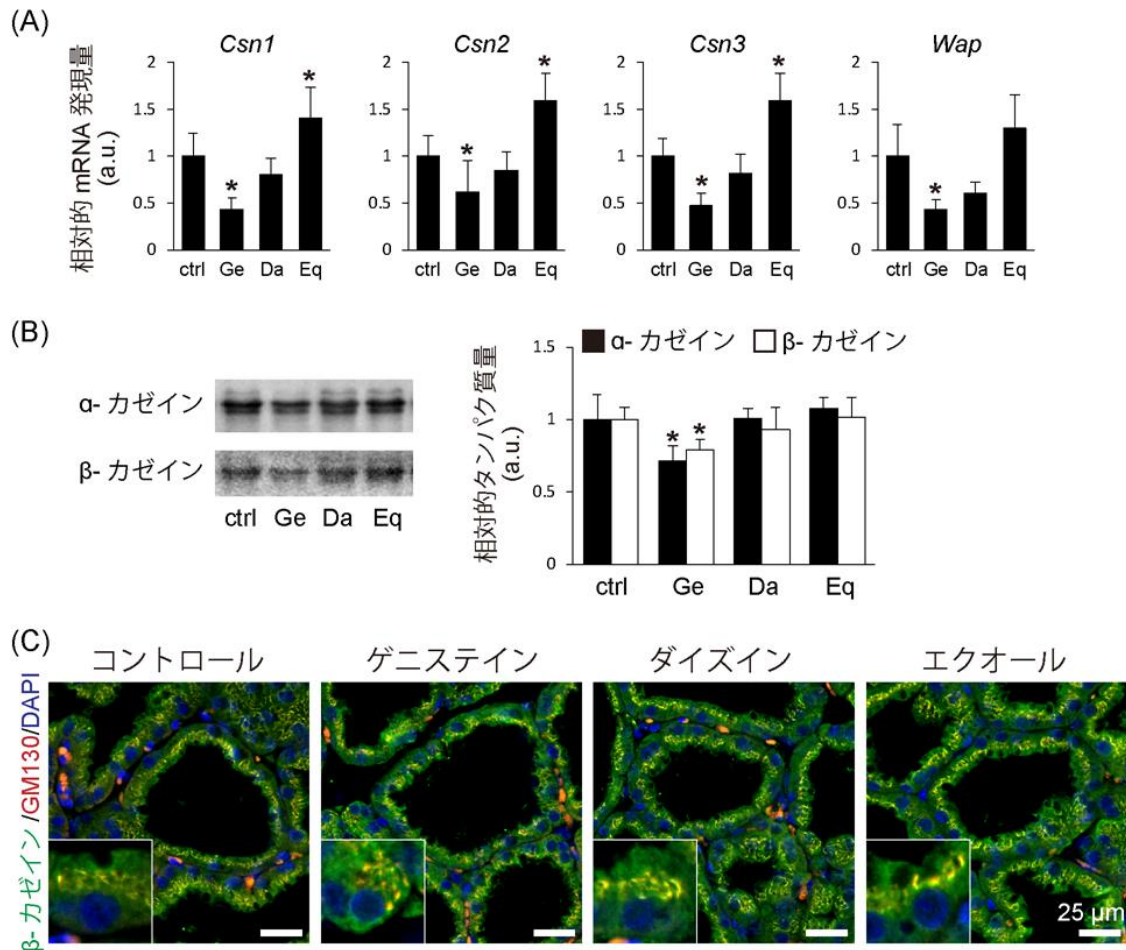


図15 植物エストロゲンの腹腔内投与が泌乳期乳腺における乳タンパク質産生に及ぼす影響
 ゲニステイン (Ge)、ダイズイン (Da)、エクオール (Eq) の腹腔内投与が泌乳期マウス乳腺における乳タンパク質産生へ及ぼす影響を示す。(A) α -カゼイン (*Csn1*)、 β -カゼイン (*Csn2*)、 κ -カゼイン (*Csn3*)、ホエイ酸性タンパク質 (*Wap*) の mRNA 発現量を示す。(B) 乳中の α -カゼインおよび β -カゼインの代表的なウェスタンブロットティング像を示す。グラフは検出したバンドをデンストメトリー解析したタンパク質量 (黒: α -カゼイン、白: β -カゼイン) を示す。縦軸は溶媒投与のコントロール群を基準とした相対的な値を示す。なお、エラーバーは標準偏差、*は $p < 0.05$ を示し、 $n = 5-7$ である。(C) β -カゼイン (緑) の代表的な免疫染色像を示す。なお、赤は GM130 (ゴルジ体マーカー)、青は DAPI (細胞核) であり、スケールバーは $25 \mu\text{m}$ を示す。

では顕著な影響は認められなかった。また、乳腺胞の免疫染色により乳腺上皮細胞におけるβ-カゼインの局在を調べた (図 15C)。コントロール群では、ゴルジ体マーカーである GM130 の領域に β-カゼインが集中して局在している様子が観察された。また、ゲニステイン投与群、ダイズイン投与群およびエクオール投与群においても同様の局在パターンが観察され、処理群間での違いは認められなかった。

泌乳期の乳腺上皮細胞は乳成分を合成するため、血液中からグルコース、グリセロール、アミノ酸などを乳成分の材料として、側底部細胞膜のトランスポーターやチャネルを介して細胞内に取り込む。そこで水/グリセロールチャネルである AQP3、グルコーストランスポーターである GLUT1、アミノ酸トランスポーターである SLC7A5 の mRNA 発現量を調べた (図 16A)。ゲニステイン投与群では *Glut1* がコントロール群の 6 割程度に減少していた。ダイズイン投与群においても *Glut1* が半減していた。一方、エクオール投与群では *Aqp3* が 2 倍以上に増加していた。また、*Slc7a5* はいずれの投与群においても顕著な影響は確認されなかった。続いて、AQP3 および GLUT1 の細胞内局在を免疫染色により調べた (図 16B)。コントロール群では、AQP3 と GLUT1 はともに側底部細胞膜に局在している様子が観察され、エクオール投与群においても同様の局在が観察された。ゲニステイン投与群およびダイズイン投与群においても AQP3 は側底部細胞膜に局在していたが、GLUT1 は基底膜の近傍に散在しており、側部細胞膜における GLUT1 の局在はほとんど観察されなかった。

乳成分産生を促進する転写因子である STAT5 と抑制する転写因子である STAT3、および STAT5 と STAT3 の上流にある JAK2 の活性化と発現量についてウェスタンブロッティングにより調べた (図 17A)。ゲニステイン投与群では pJAK2 量がコントロール群の 7 割程度、JAK2 量が 8 割程度、pSTAT5 量が 7 割程度に減少していたが、統計的な有意差は確認されなかった。ダイズイン投与群では、pSTAT5 量がコントロール群の約 1.8 倍に増加していたが、STAT5 量はコントロール群と同レベルであった。エクオール投与群では、pSTAT3

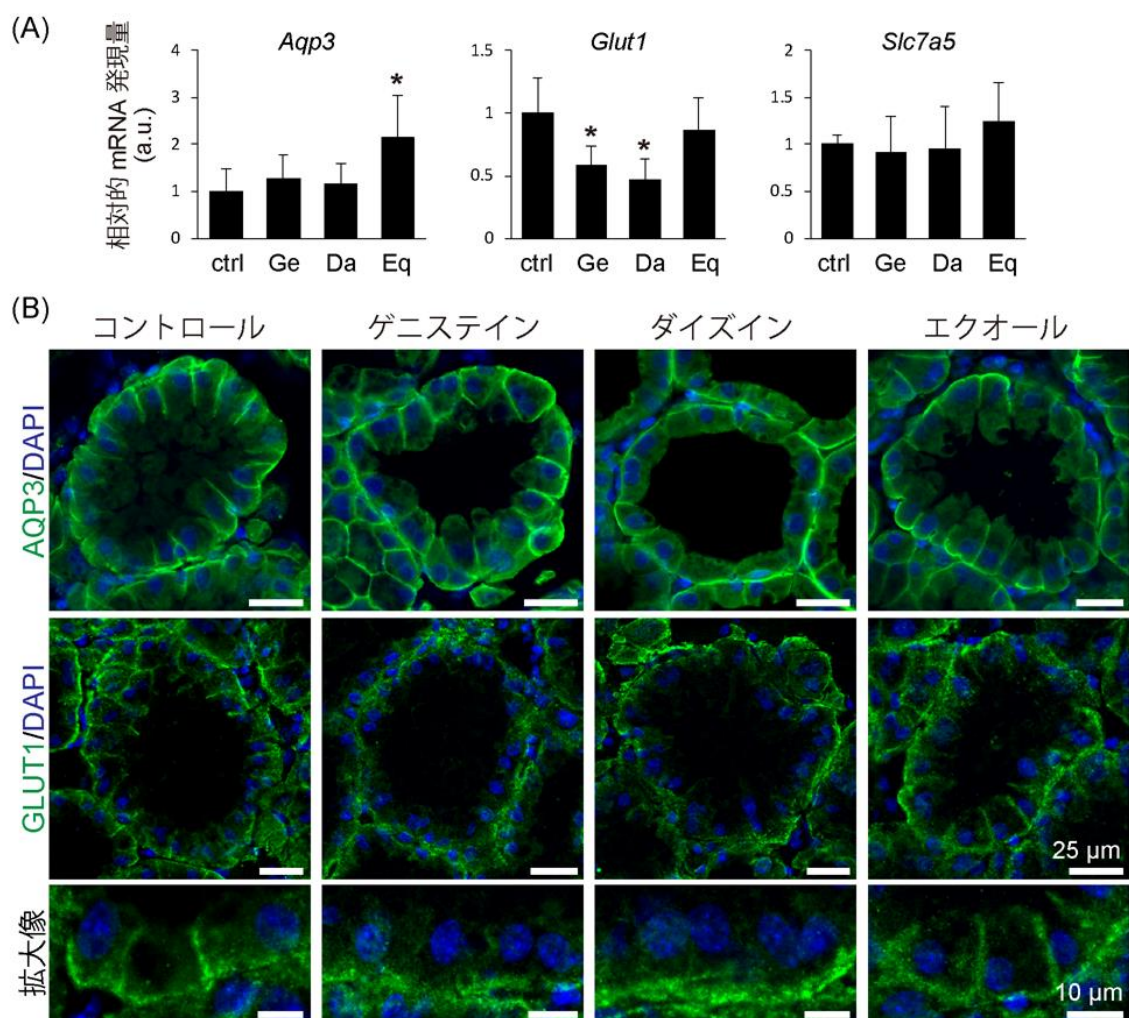


図16 植物エストロゲンの腹腔内投与が泌乳期マウス乳腺におけるトランスポーターおよびチャネルに及ぼす影響

ゲニステイン (Ge)、ダイズイン (Da)、エクオール (Eq) の腹腔内投与が泌乳期マウス乳腺におけるトランスポーターおよびチャネルへ及ぼす影響を示す。(A) *Aqp3*、*Glut1*、*Slc7a5* の mRNA 発現量を示す。縦軸は溶媒投与のコントロール群を基準とした相対的な値を示す。なお、エラーバーは標準偏差、*は $p < 0.05$ を示し、 $n = 5-7$ である。(B) AQP3 (緑) および GLUT1 (緑) の代表的な免疫染色像を示す。なお、青は DAPI (細胞核) であり、スケールバーは $25\ \mu\text{m}$ もしくは $10\ \mu\text{m}$ を示す。

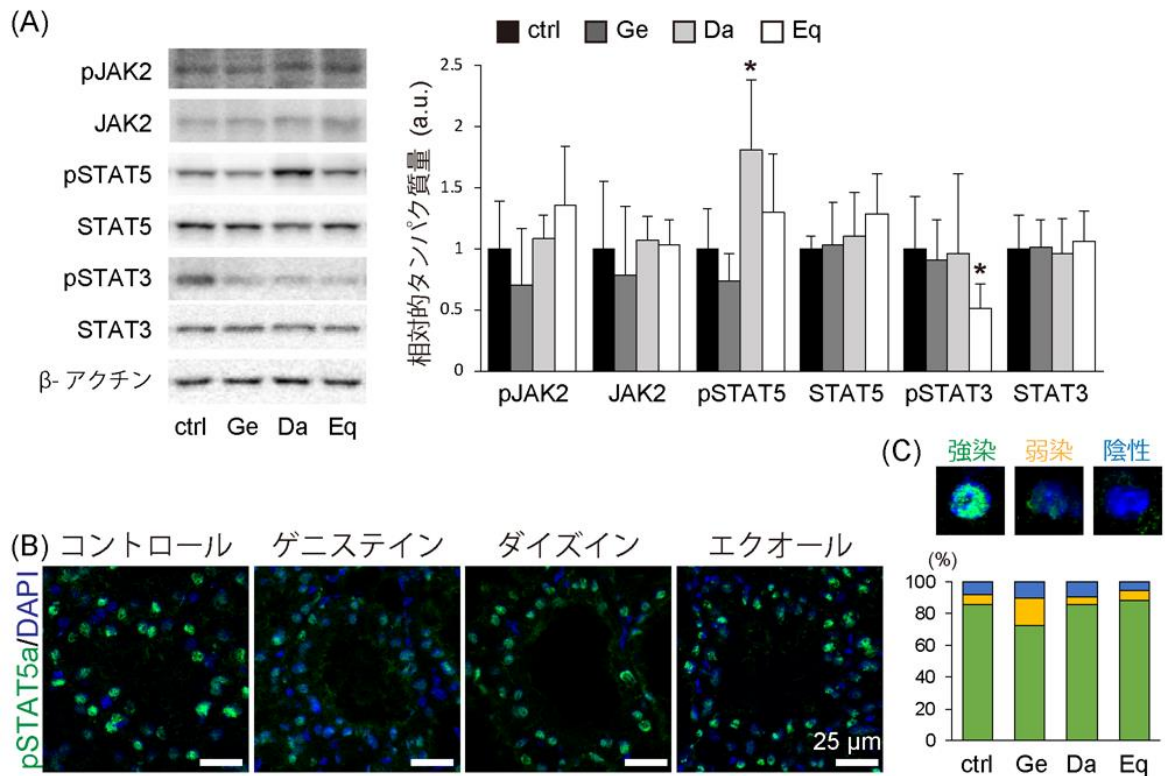


図17 植物エストロゲンの泌乳期マウスへの腹腔内投与がSTAT5経路およびSTAT3経路に及ぼす影響

ゲニステイン (Ge)、ダイズイン (Da)、エクオール (Eq)の腹腔内投与が泌乳期マウス乳腺におけるSTAT5経路およびSTAT3経路へ及ぼす影響を示す。(A) 乳腺組織におけるpJAK2、JAK2、pSTAT5、STAT5、pSTAT3、STAT3およびβ-アクチンの代表的なウェスタンブロッティング像を示す。グラフは検出したバンドをデンストメトリー解析したタンパク質量を示す。縦軸は溶媒投与のコントロール群を基準とした相対的な値を示す。なお、エラーバーは標準偏差、*は $p < 0.05$ を示し、 $n = 5-7$ である。(B) pSTAT5a (緑)の代表的な免疫染色像を示す。青はDAPI (細胞核)であり、スケールバーは25 μm を示す。(C) グラフは細胞核におけるpSTAT5aの染色パターンを強染、弱染、陰性に分類し、総細胞核に対するそれぞれの割合を示す。

量が半減していたが、STAT3 量はコントロール群と同レベルであった。また、pSTAT5a の局在を観察するため、免疫染色を行った (図 17B)。コントロール群では、大半の乳腺上皮細胞で pSTAT5a が核内に局在する様子が観察され、ダイズイン投与群およびエクオール投与群においても同様の染色パターンが観察された。一方、ゲニステイン投与群では、核内の pSTAT5a の陽性反応が弱いものや陰性のものが散見された。そこで核内における pSTAT5a の染色パターンを強染、弱染および陰性に分類し、それぞれの割合を調べた (図 17C)。コントロール群、ダイズイン投与群、エクオール投与群では強染が 80% 台、弱染と陰性が 10% 以下であった。一方、ゲニステイン投与群では強染が 72.5%、弱染が 16.9%、陰性が 10.6% であった。

続いて、各植物エストロゲンが EGFR 経路と ER 経路に及ぼす影響についてウェスタンブロッティングにより調べた (図 18)。ゲニステイン投与群では、pERK1/2 量がコントロール群の半分程度に減少していたが、ERK1/2 量はコントロール群と同レベルであった。また、ゲニステイン投与群では pEGFR、EGFR、pER α 、ER α 、ER β の各量に対する顕著な影響は確認されなかった。一方、ダイズイン投与群では pEGFR 量が約 1.5 倍、EGFR 量が約 1.2 倍に増加し、pER α 量も 1.4 倍に増加していた。エクオール投与群でも pER α 量が約 1.5 倍に増加していた。ER α 量および ER β 量も約 1.2 倍増加していたが、統計的な差は確認されず、pEGFR 量および EGFR 量に対する顕著な影響も確認されなかった。

2.7 ゲニステインが乳腺上皮細胞の乳産生に及ぼす影響の作用機序

ゲニステインは、生理的濃度処理 (5 μ M、7 日間)、高濃度処理 (25 μ M、2 日間) および腹腔内投与のいずれにおいても乳腺上皮細胞の乳産生に対して阻害的な影響を及ぼしていた。そこで、ゲニステインが乳腺上皮細胞の乳産生に及ぼす影響の作用機序をさらに解明するため、まず、乳腺上皮細胞の乳産生を上方調節する STAT5 の不活性化に及ぼすゲニステイン 25 μ M の作用時間を調べた (図 19A)。その結果、ゲニステイン処理 6 時間後におい

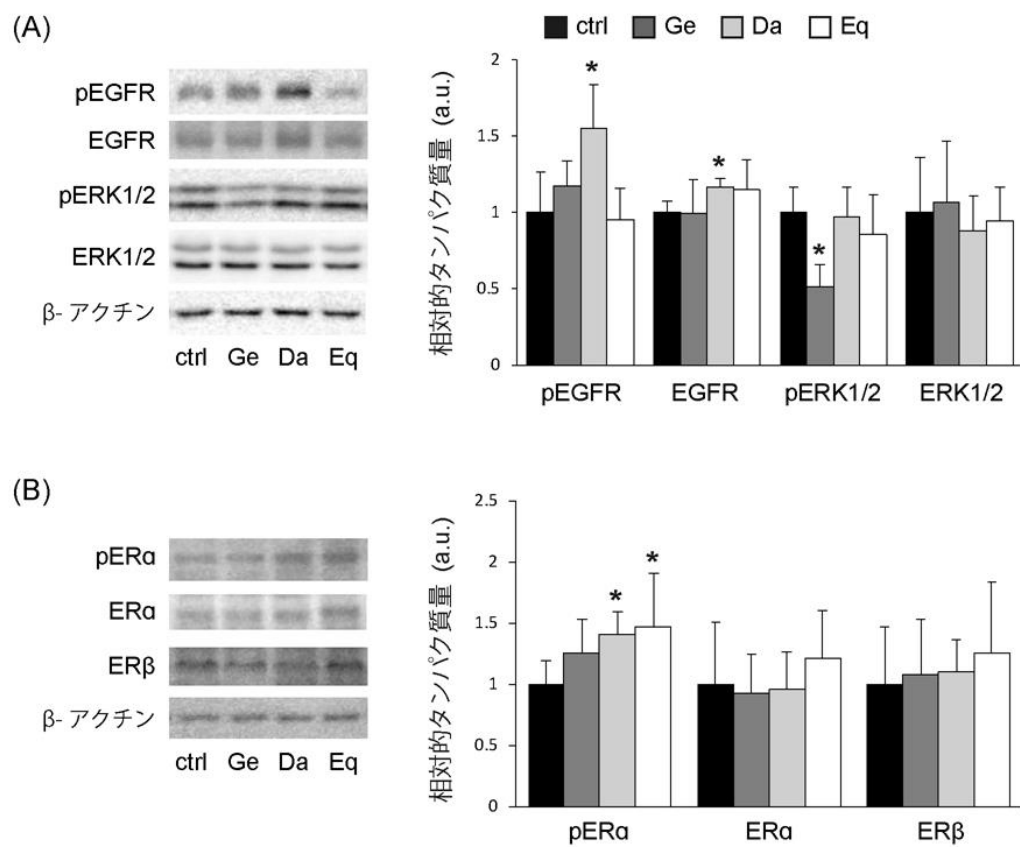


図18 植物エストロゲンの泌乳期マウスへの腹腔内投与がEGFR経路とER経路に及ぼす影響

ゲニステイン (Ge)、ダイズイン (Da)、エクオール (Eq) の腹腔内投与が泌乳期マウス乳腺におけるEGFR経路 (A) およびER経路 (B) へ及ぼす影響を示す。グラフは検出したバンドをデンストメトリー解析し、β-アクチンで標準化したタンパク質量を示す。縦軸は溶媒投与のコントロール群を基準とした相対的な値を示す。なお、エラーバーは標準偏差、*は $p < 0.05$ を示し、 $n = 5-7$ である。

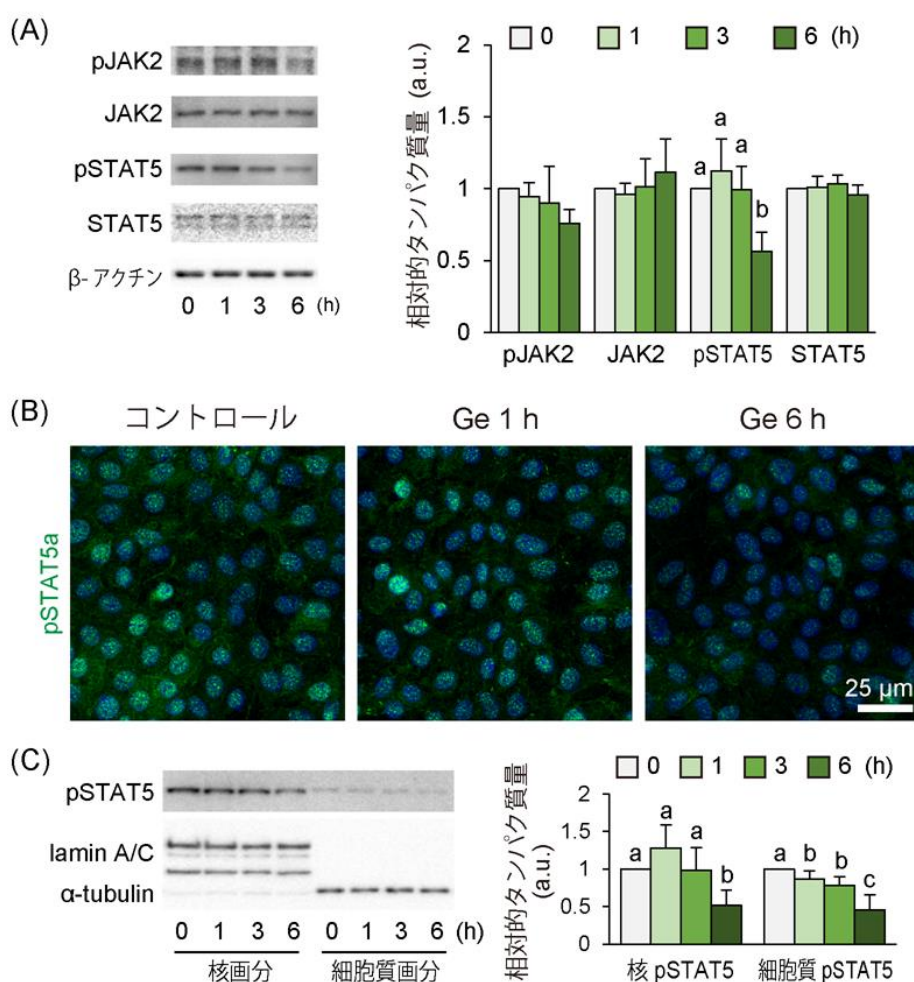


図19 ゲニステイン (Ge)の1-6時間処理がJAK2-STAT5経路に及ぼす影響

乳腺上皮細胞をGe存在下で1-6時間培養した。(A) 乳腺上皮細胞における各タンパク質量の代表的なウェスタンブロットティング像を示す。グラフは検出したバンドをデンスitrometry解析し、β-アクチンで標準化したものを示す。(B) pSTAT5a (緑)の代表的な免疫染色像を示す。青はDAPI (細胞核)、スケールバーは25 μmを示す。(C) 培養終了後、核画分と細胞質画分に分画し、ウェスタンブロットティングを行った。pSTAT5、lamin A/Cおよびα-tubulinの代表的なウェスタンブロットティング像を示す。核pSTAT5はlamin A/C、細胞質pSTAT5はα-tubulinで標準化した値を示す。なお、グラフの縦軸は未添加処理であるコントロール群を基準とした相対的な値を示す。エラーバーは標準偏差、n = 6-10、異符号間に有意差あり (p < 0.05)。

て、pSTAT5 量がコントロール群の 6 割以下に減少しており、統計的な有意差も確認された。また、有意差は確認されなかったが、STAT5 上流の pJAK2 量も 7.5 割程度に減少していた。一方、ゲニステイン 1 時間処理や 3 時間処理では、pJAK2 量や pSTAT5 量には顕著な変化は確認されなかった。続いて、ゲニステイン処理が pSTAT5a の局在に及ぼす影響を免疫染色により調べた (図 19B)。コントロール群では大半の乳腺上皮細胞において、細胞核に pSTAT5a が局在している様子が観察された。ゲニステイン処理 1 時間後においてもコントロール群と同様に細胞核における pSTAT5a の局在が観察され、一部の細胞核ではより強い pSTAT5a の染色が観察された。一方、ゲニステイン処理 6 時間後では、大半の細胞核で pSTAT5a に対する陽性反応は観察されなかった。この STAT5 の核内移行を生化学的に確認するため、乳腺上皮細胞を核画分と細胞質画分に分画し、各画分の pSTAT5 量をウェスタンブロッティングにより調べた (図 19C)。ゲニステイン処理 6 時間後、核画分 pSTAT5 量はコントロール群の半分程度に減少していた。また、細胞質画分 pSTAT5 量もゲニステイン処理 1 時間後には有意に減少し、その後も減少し続けていた。

乳腺上皮細胞の乳産生は GR 経路と AKT-mTOR 経路によっても促進される (Reichardt et al. 2001; Li et al. 2020)。また、ゲニステインは EGFR のチロシンキナーゼ活性を阻害することが報告されている (Akiyama et al. 1987)。そこで、ゲニステインが乳腺上皮細胞の GR 経路、AKT-mTOR 経路、および EGFR とその下流の MEK1/2-ERK1/2、p38、JNK へ及ぼす影響を調べた (図 20)。ゲニステイン存在下において pEGFR 量は処理時間依存的に増加し、処理 3 時間後、6 時間後にはそれぞれコントロール群の約 1.4 倍、1.5 倍に増加していた。また、pMEK1/2 量は処理 6 時間後において 1.5 倍以上に増加していた。一方、GR 経路 (pGR、GR)、AKT-mTOR 経路 (pAKT、AKT、pmTOR、mTOR)、ERK1/2、p38 および JNK に対する顕著な影響は確認されなかった。

EGFR 経路に対する影響がゲニステイン処理 1-6 時間で確認されたため、さらに短時間 (5、15、60 分間) の影響を調べた (図 21)。ゲニステイン 5 分間処理によって pERK1/2 量は

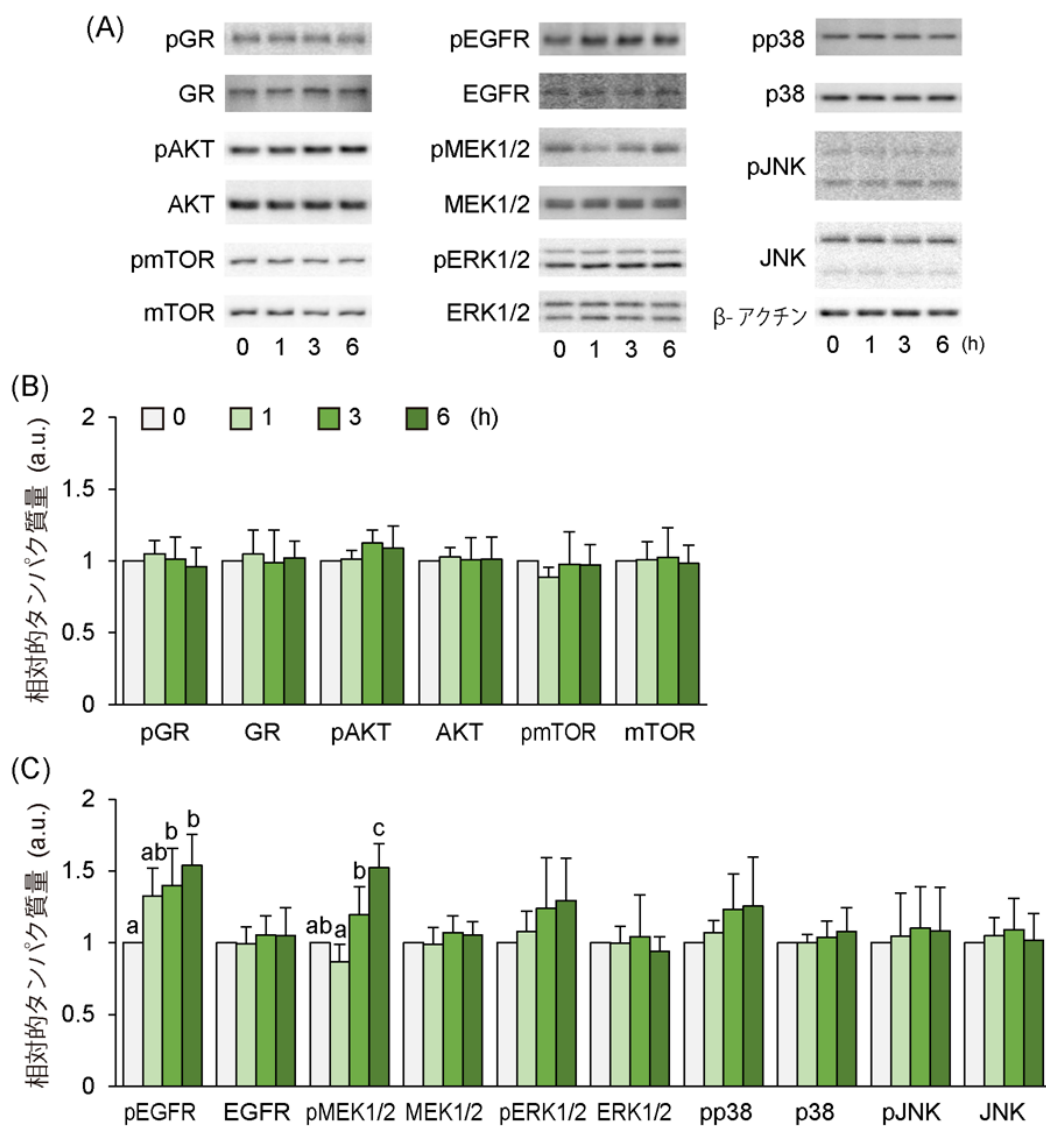


図20 ゲニステインの1-6時間処理が乳産生とEGFRに関わる細胞内シグナル経路に及ぼす影響
 ゲニステイン存在下で1-6時間培養した。(A) 乳腺上皮細胞における各タンパク質量の代表的なウェスタンブロットティング像を示す。(B, C) グラフは検出したバンドをデンストメトリー解析し、 β -アクチンで標準化したものを示す。なお、グラフの縦軸は未添加処理であるコントロール群を基準とした相対的な値を示す。エラーバーは標準偏差、n = 6-10、異符号間に有意差あり (p < 0.05)。

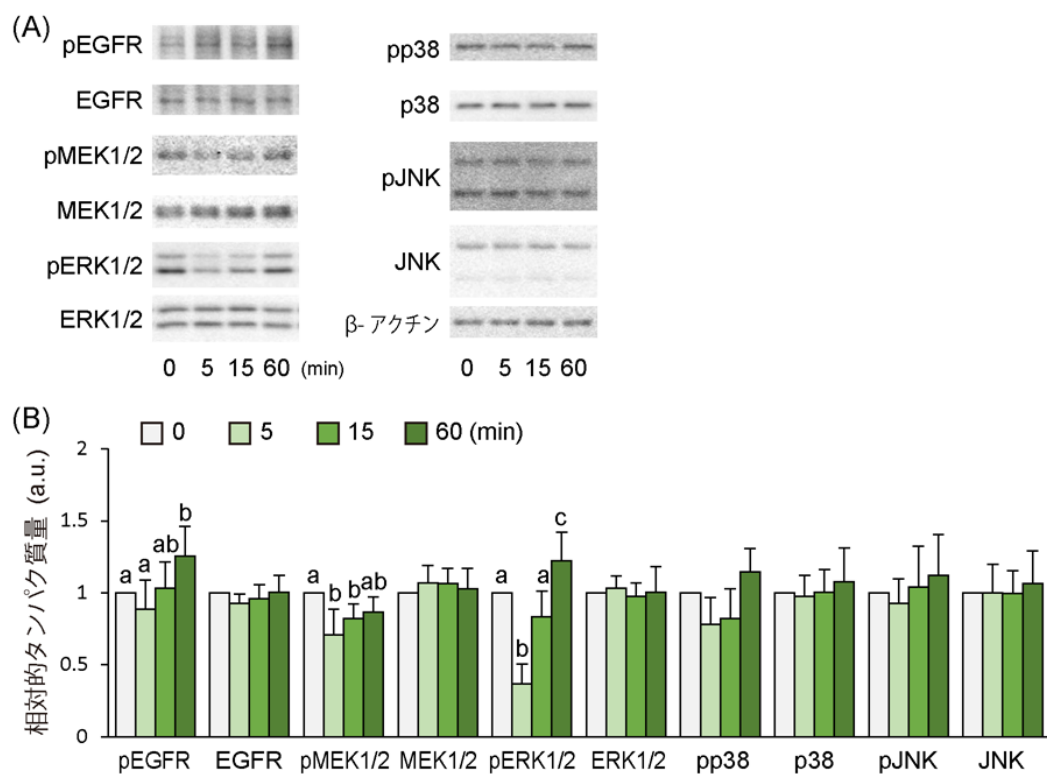


図21 ゲニステインの5-60分間処理が細胞内シグナル経路に及ぼす影響

ゲニステイン存在下で5-60分間培養した。(A)乳腺上皮細胞における各タンパク質量の代表的なウェスタンブロッティング像を示す。(B)グラフは検出したバンドをデンストメトリー解析し、 β -アクトチンで標準化したものを示す。なお、グラフの縦軸は未添加処理であるコントロール群を基準とした相対的な値を示す。エラーバーは標準偏差、 $n = 6-10$ 、異符号間に有意差あり ($p < 0.05$)。

コントロール群の 4 割以下に減少し、統計的な有意差も確認された。また、pMEK1/2 量も処理 5 分後、15 分後においてそれぞれ 7 割程度、8 割程度に有意に減少していた。一方、ゲニステイン処理 60 分後には pEGFR 量および pERK1/2 量が 1.2 倍以上に増加していた。pp38、p38、pJNK、JNK の各量に対する顕著な影響は確認されなかった。

ゲニステインは、処理 5 分後には pERK1/2 量を減少させ、処理 6 時間後には乳産生の主要シグナルである STAT5 のリン酸化量を減少させていた。そこで、ゲニステインは EGF-ERK1/2 経路の遮断を介して pSTAT5 量の減少を引き起こしているのかを検証するため、乳腺上皮細胞の乳分泌を誘導後、分化培地から EGF を除去して 2 日間培養し、さらに EGFR 活性阻害剤である AG1478 をゲニステイン処理開始 2 時間前に添加することによって、乳腺上皮細胞の EGF-ERK1/2 経路を不活性化状態に誘導した (図 22A)。この EGF 非存在下・EGFR 活性阻害剤存在下において pEGFR と pERK1/2 のバンドはほとんど検出されなかった。また、EGF 存在下のコントロール (+EGF ctrl) と EGF 経路阻害 (-EGF+AG ctrl) を比較したところ、EGF 経路不活性化状態において EGF 経路 (pEGFR、pMEK1/2、MEK1/2、pERK1/2、ERK1/2) が全体的に抑制され、pJAK2 量および STAT5 量もそれぞれ 6 割程度、7 割程度に減少していた。この EGF 経路不活性化状態の乳腺上皮細胞にゲニステインを添加すると、EGF 経路活性化状態と同様に添加 6 時間後には pSTAT5 量を半減させていた。また、ゲニステイン添加 5 分後と 1 時間後においては顕著な影響は確認されなかった。

さらに、ゲニステイン処理 5 分後に減少した pERK1/2 量が 6 時間後の pSTAT5 量の減少を引き起こしているかを検証するため、ゲニステインを処理 5 分後には培地から除去し、その 6 時間後の pSTAT5 量を調べた (図 22B)。ゲニステインを継続的に 6 時間処理した群では pSTAT5 量はコントロール群の 6 割以下に減少し、ゲニステインを 5 分間のみ処理した群では pERK1/2 量がコントロール群の 2 割程度に減少していたが、5 分後にゲニステインを除去した群では、pSTAT5 量も pERK1/2 量もコントロール群と同程度の値を示していた。以上のことから、ゲニステイン処理 6 時間後における STAT5 の不活性化には EGF 経

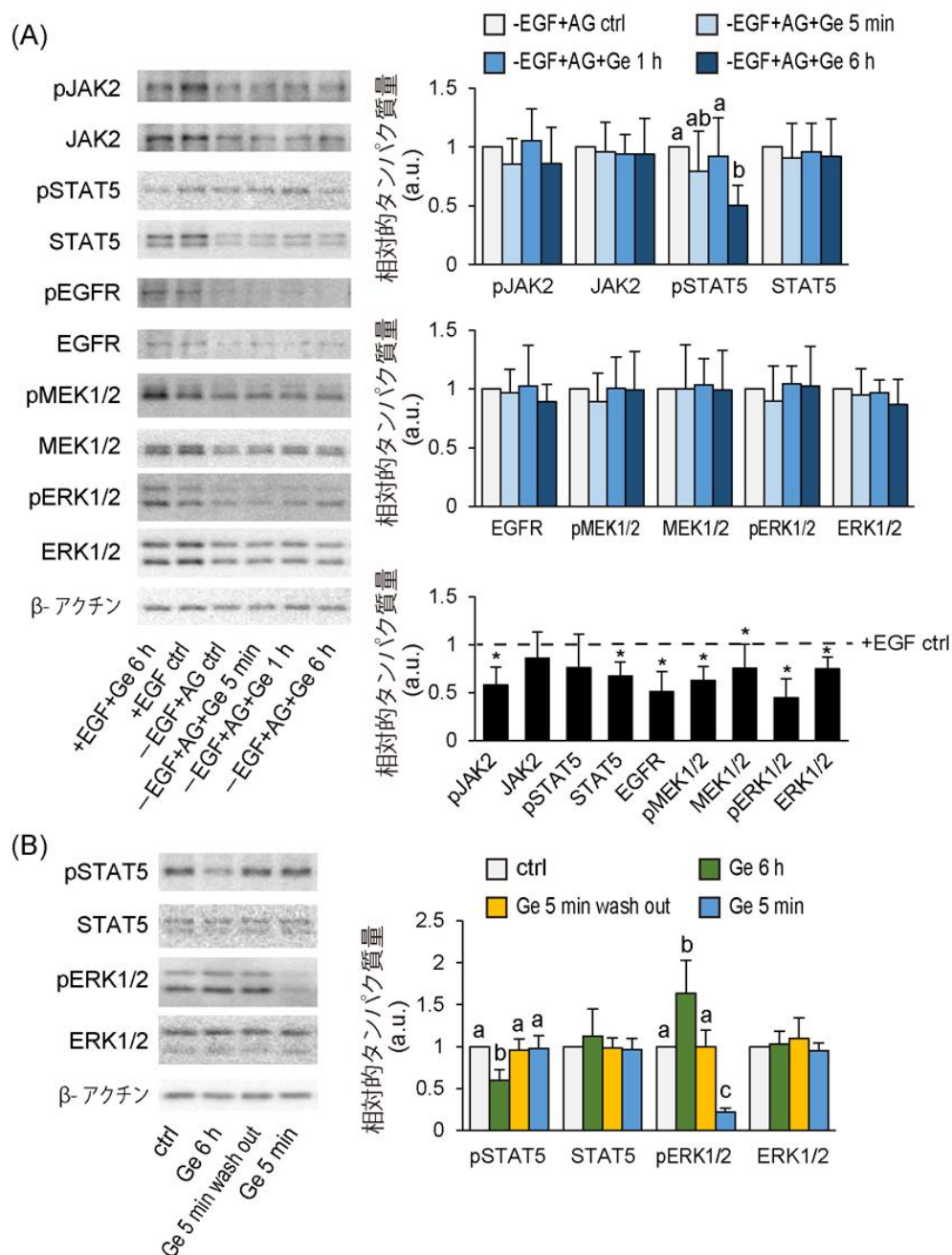


図22 ゲニステイン (Ge)による乳腺上皮細胞のSTAT5不活性化にEGF経路が及ぼす影響

(A) EGF経路不活性状態によるGeの影響を調べるため、乳分泌誘導後、培地中からEGFを除去して2日間培養した。続いて、EGFR活性阻害剤 (AG1478)を2時間処理した後、Geを添加した。(B) Ge 5分間処理によるERK1/2不活性化がSTAT5経路の阻害に関与するかを検証するため、Ge処理5分間後に培地交換を行い、6時間培養を行った。各タンパク質量の代表的なウェスタンブロットング像を示す。グラフは検出したバンドをデンストメトリー解析し、β-アクトリンで標準化したものを示す。なお、グラフの縦軸は未添加処理であるコントロール群を基準とした相対的な値を示す。エラーバーは標準偏差、n = 6-8、異符号間に有意差あり ($p < 0.05$)。

路は関与していないと考えられた。

最後に、ゲニステインが JAK2-STAT5 経路を直接的に阻害しているかを検証するため、乳腺上皮細胞をプロラクチン非存在下で培養し、STAT5 が活性化していない状態にした上で、ゲニステイン処理を行い、その後にプロラクチンを培地に添加することによって乳腺上皮細胞の JAK2 および STAT5 が新たに活性化するかどうかを調べた (図 23)。まず、ゲニステイン処理を施していない乳腺上皮細胞におけるプロラクチン添加後の JAK2 および STAT5 のリン酸化状態を調べたところ、pJAK2 量と JAK2 量は添加直前から 6 時間後までの間ほとんど変化していなかったが、pSTAT5 は添加 5 分後には明瞭なバンドが検出され、プロラクチン添加によって STAT5 が新たにリン酸化されていることが明らかになった (図 23A)。また、ゲニステイン存在下においてもプロラクチン添加 5 分後から pSTAT5 のバンドが検出されたが、そのバンドは薄く観察された (図 23B)。そこで、プロラクチン添加 5、30、60 分後の JAK2 と STAT5 のリン酸化レベルを定量化するため、ウェスタンブロッティングとそのバンドのデンスitrometry解析を行った (図 23C、D)。ゲニステイン非存在下ではプロラクチン添加 5 分間後と比べ、添加 30 分間後には pSTAT5 量が約 1.8 倍に増加し、添加 60 分後には約 1.4 倍の値を示していた。一方、ゲニステイン存在下におけるプロラクチン添加後の pSTAT5 量は、いずれの添加時間においてもゲニステイン非存在下の pSTAT5 量よりも少なく、プロラクチン添加 5 分後から 60 分後までほとんど増加していなかった。以上のことから、ゲニステイン存在下ではプロラクチン刺激による STAT5 のリン酸化が抑制されることが明らかになった。

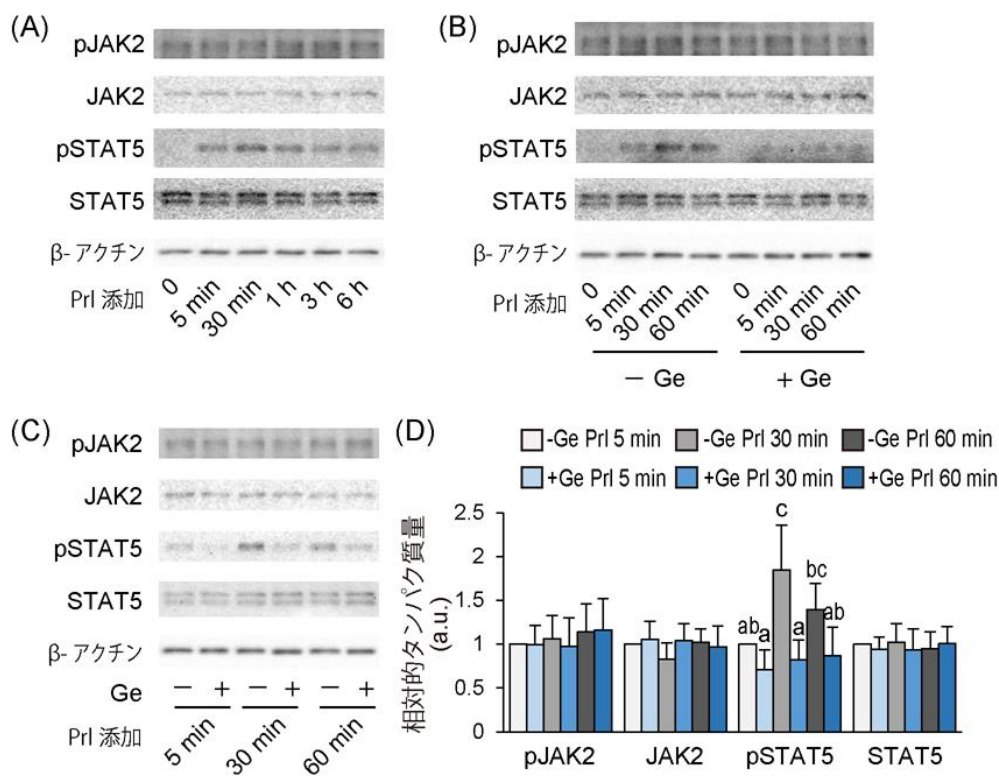


図23 ゲニステイン (Ge)存在下におけるプロラクチン刺激がSTAT5活性化に及ぼす影響
 増殖培地で培養後、Geを6時間処理した。その後、プロラクチン (Prl)を添加してJAK2/STAT5経路への影響を調べた。各タンパク質のウェスタンブロットティング像および検出したバンドをデンストメトリー解析し、 β -アクチンで標準化したグラフを示す。縦軸はコントロール群を基準とした相対的な値を示す。なお、エラーバーは標準偏差、n = 8-10、異符号間に有意差あり (p < 0.05)。

3 考察

マメ科植物には多種多様な植物エストロゲンが含まれている。植物エストロゲンとはエストロゲン様の構造と生理活性を有する植物由来成分の総称であるが、植物エストロゲンが性成熟期や妊娠期の乳腺発達に及ぼす影響は種類別に異なる (Mishra et al. 2009; Rahal and Simmen 2010; Mishra et al. 2011; Zafar et al. 2017)。しかし、植物エストロゲンが泌乳期の乳腺上皮細胞に及ぼす影響はほとんど検証されておらず、その種類別の影響もわかっていない。そこで、本章では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。

泌乳期の乳腺上皮細胞は強固な TJ を形成し、その細胞間隙をシールすることによって乳成分と血液成分が漏出しないようにしている (Blood-milk barrier) (Pitelka et al. 1973; Linzell and Peaker 1974)。しかし、この Blood-milk barrier に対して各植物エストロゲンがどのように作用するかは調べられていない。TJ のバリア機能はオクルディンやクロードインなどの TJ 構成タンパク質の組成によって決定される (Tsukita and Furuse 2000a, b; Kobayashi and Kumura 2011)。特に、乳腺上皮細胞における TJ のバリア機能は、クロードイン-3 とクロードイン-4 の発現パターンと密接にリンクしており、泌乳期にはクロードイン-3 の増加とクロードイン-4 の減少によって強固な TJ が形成される (Kobayashi and Kumura 2011)。一方、離乳直後や乳房炎を発症した乳腺では、クロードイン-4 が増加し、TJ バリア機能が低下する (Kobayashi et al. 2013; Uejyo et al. 2015)。そこで、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。そこで、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。さらに、上皮細胞層のバリア機能は細胞死による層構造の一部欠損によっても低下する (Zhang et al. 2015; Delgado et al. 2016)。HE 染色により乳腺上皮細胞層を観察したところ、クメストロールおよびゲニステインでは乳腺上皮細胞が剥離した部分が確認された。また、アポトーシスのエフェクターであるカスパーゼ 3 の活性化がクメストロールとゲニステインにおいて観察された。さらに、クメストロールとゲニステインがアポトーシスのシグナル経路に影響を及ぼしていることはアポトーシス促進因子である Bax とアポトーシス抑制因子である Bcl2 の

増減からも示唆された。これらの結果は、クメストロールとゲニステインがアポトーシスを誘導するという報告とも一致している (Moon et al. 2009; Castro et al. 2016)。一方、ダイズインでは細胞死の誘導や Bax、Bcl2 への影響は確認されず、TJ 構成タンパク質のネットワークへの影響も観察されなかった。以上より、各植物エストロゲンは Blood-milk barrier に対して TJ と細胞死を介して異なる影響を及ぼすことが明らかになった。今後、ダイズインによる TJ バリア機能の低下が何に起因しているか調べる必要がある。

泌乳期の乳腺上皮細胞における乳産生は、主にプロラクチン/STAT5 経路とグルコルチコイド/GR 経路により上方調節されている (Watson and Burdon 1996; Levy and Darnell 2002)。特に、代表的な乳成分である β -カゼインの発現は両経路の活性化によって相乗的に上方調節される (Kobayashi et al. 2017)。そこで、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、PRLR 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。

植物エストロゲンは種類依存的に異なる細胞内シグナル経路を活性化/不活性化することが知られている。例えば、ビオカニン A、ゲニステインおよびホルモノネチンはチロシンキナーゼ活性の阻害作用を示す (Akiyama et al. 1987; Manna 2012)。チロシンキナーゼは PRLR 下流における STAT5 の活性化や EGFR 下流における ERK1/2、p38、JNK の活性化にも関与する (Watson and Burdon 1996; Martin-Perez et al. 2015; Kobayashi et al. 2017)。本章における検証では、ゲニステインは *in vitro* と *in vivo* の両方で乳腺上皮細胞の乳産生に対して阻害作用を示していた。この阻害作用は STAT5 経路に対して直接的に作用しているのか、あるいは EGFR-ERK1/2、p38、JNK 経路を介しているのかを明らかにするため、ゲニステインの作用機序について検証した。ゲニステインは処理直後に pERK1/2 量を減少させるとともに、処理 6 時間後には pSTAT5 量を減少させていた。一方、ゲニステインは EGF-ERK1/2 経路の活性化/不活性化に関わらず pSTAT5 量を減少させていた。そのため、ゲニステインによる pSTAT5 量の減少は EGF-ERK1/2 経路は関与しないと考えられる。一方、ゲニステインの処理時間依存的に細胞質画分の pSTAT5 量は減少していた。また、ゲニステイン存在下ではプロラクチン刺激による新たな STAT5 のリン酸化が阻害されていた。しかし、EGF-ERK1/2 経路不活性化状態では、EGF 経路活性化状態と比べて STAT5 量の減少も確認された。そのため、ゲニステインの乳産生阻害作用は短期的には STAT5 の新規リン酸化の阻害によって、長期的には EGF 経路の不活性化を介した STAT5 量の減少によって引き起こされていると考えられる。先行研究において、クメストロールは JAK/STAT 経路を調節するセリン・スレオニンキナーゼであるカゼインキナーゼ 2 への阻害作用を示すことが報告されている (Zheng et al. 2011; Liu et al. 2013)。また、植物エストロゲンは ER と結合してその下流のシグナル経路を調節するが、各植物エストロゲンの ER に対する親和性や下流シグナルの活性化/不活性化への影響も異なる (Pfitcher et al.

2008; Pilsakova et al. 2010)。したがって、ゲニステイン以外の他の植物エストロゲンも特定の細胞内シグナル経路を介して乳腺上皮細胞の乳産生能力に対して異なる影響を及ぼしていることが示唆される。

本章より、各植物エストロゲンは乳腺上皮細胞の乳産生能力や TJ バリアに対して影響を及ぼし、その作用は植物エストロゲンの種類や濃度に応じて変化することが明らかになった (表 1)。ヒトの場合、植物エストロゲンの血中濃度はマメ科植物摂取直後から上昇し、8–12 時間後にはゲニステインで 5 μM 、ダイズインで 2 μM に達する (Gardner et al. 2009)。さらに、日常的なマメ科植物の摂取により植物エストロゲンの血中濃度も増加する (Mathey et al. 2006)。このような生理的条件下においても、ゲニステインによる乳産生阻害作用やエクオールによる乳産生促進作用が確認された。すなわち、日常的に摂取するレベルにおいても植物エストロゲンは乳腺上皮細胞の乳産生に対しても種類依存的な影響を及ぼしていると推測される。また、興味深いことに、植物エストロゲンは代謝経路上流では乳産生に対して阻害的に作用し、代謝経路下流の代謝産物では乳産生を促進する作用が確認された。生体において、植物エストロゲンは消化管や肝臓で代謝される。したがって、健全な植物エストロゲン代謝能力を有する個体では植物エストロゲンによる負の作用は少なく、代謝不良の個体では乳産生に対して阻害的に作用する可能性がある。今後、植物エストロゲンの研究を生体レベルで行う際には、各個体の植物エストロゲンの代謝能力も考慮した解析が必要であると考えられる。

表1 植物エストロゲンがマウス由来乳腺上皮細胞に及ぼす影響

	ビオカニン A → ゲニステイン → パラエチルフェノール		
乳成分産生	↘	↘	—
TJ バリア機能	—	↘	—
STAT5 経路	↘	↘	—
GR 経路	↘	↘	↗
	ホルモノネチン → ダイズイン → エクオール		
乳成分産生	↘	↗	↗
TJ バリア機能	—	↘	—
STAT5 経路	↘	↗	↗
GR 経路	↗	↗	—
クメストロール 乳成分産生 ↘ TJ バリア機能 ↘ STAT5 経路 ↘ GR 経路 ↘			

第三章 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

1 序文

前章でのマウスを用いた検証により、植物エストロゲンは乳腺上皮細胞の乳産生能力と TJ による Blood-milk barrier 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た。先行研究において、乳腺上皮細胞の乳産生能力と Blood-milk barrier に関与する分子群はウシとマウスの種間でほぼ共通していることが報告されている (Singh et al. 2016; Wang et al. 2019)。しかし、マウスとウシでは乳腺発達の期間や泌乳期間が異なるため、植物エストロゲンに暴露される時間が異なる (Rowson et al. 2012)。また、ウシは反芻動物でマウスは単胃動物であり、植物エストロゲンの代謝変換経路が異なる。さらに摂取する飼料も草食動物のウシと雑食動物のマウスでは異なるため、ウシとマウスでは体内に吸収する植物エストロゲンの種類や量が異なり、乳腺上皮細胞の植物エストロゲンに対する感受性が異なるかもしれない。

これまで乳牛における乳産生メカニズムを細胞レベルで解明するため、ウシ由来の乳腺上皮細胞を用いた数々の *in vitro* 乳分泌モデルが作製されてきた。これらの培養モデルにおけるウシ乳腺上皮細胞は、乳タンパク質である β -カゼインの mRNA 発現や乳脂質の合成などを再現している (Sakamoto et al. 2005; Zhao et al. 2010; Xu et al. 2018)。しかし、前章のマウス乳腺上皮細胞を用いた乳分泌モデルのように、生体同様の頂端部細胞膜からの乳分泌と強固な TJ 形成を同時に再現した培養モデルは報告されていない。

泌乳期の乳腺上皮細胞は、側底部細胞膜に存在する輸送体を介して栄養素を取り込み、頂端部細胞膜から乳腺胞内腔へ合成した乳成分を分泌する (Anderson et al. 2007; Truchet and Ollivier-Bousquet 2009)。このように、乳成分分泌の方向性が明確な乳産生経路 (細胞極性) の確立には TJ が必要不可欠である。なぜなら、細胞膜を貫通する構造物である TJ は側底部細胞膜領域と頂端部細胞膜領域に存在する膜タンパク質を区画し、側底部細胞膜に

における GLUT1 や頂端部細胞膜における Toll-like receptor (TLR)などの膜タンパク質の特異的な局在を維持しているからである (Cereijido et al. 1998; Shin et al. 2006)。また、泌乳期の乳腺上皮細胞に形成される強固な TJ は、Blood-milk barrier として乳成分が体内に漏出することを防いでいる。すなわち、乳腺上皮細胞における乳産生を生体同様に再現するためには、乳腺上皮細胞の乳産生能力を誘導するだけでなく、TJ 形成も誘導する必要があるのである。これまで、小腸上皮細胞をセルカルチャーインサート上で培養することによって生体同様に TJ を形成させ、その細胞極性を *in vitro* で再現したことが報告されている (Speer et al. 2019)。また、乳腺上皮細胞では足場を I 型コラーゲンでコーティングした場合、カゼインの発現量が増加することが報告されている (Lee et al. 1985)。そこで本章では、ウシ乳腺上皮細胞をセルカルチャーインサート上や I 型コラーゲングル上で培養し、生体同様に TJ を形成させ、なおかつ主要な乳成分の分泌を頂端部細胞膜から行う *in vitro* 乳分泌モデルの確立を試みた。

また、本章では作製した乳分泌モデルの生体反映性を評価するため、乳房炎起炎菌毒素を用いた検証を行った。乳房炎は乳頭口から病原菌が侵入し、乳腺内で炎症反応を引き起こすことで発症する (Ruegg 2017; Derakhshani et al. 2018)。乳房炎起炎菌として 150 種類以上の病原菌が報告されており、代表的な病原菌として *Escherichia coli* と *Staphylococcus aureus* が挙げられる (Bradley 2002)。これらの病原菌は、それぞれの細胞壁成分であるリポ多糖 (LPS) およびリポタイコ酸 (LTA) を介して乳腺の炎症を引き起こし、乳牛の乳産生を低下させることが報告されている (Akira et al. 2001; Hertl et al. 2011)。そこで、LPS および LTA を作製した乳分泌モデルの培地に添加し、作製した乳分泌モデルにおいても生体同様に炎症反応と乳産生低下が起きるかを調べ、その生体反映性を検証した。

さらに、作製した乳分泌モデルが生体のウシを用いた動物実験よりも有効な場合があるか否かについても検証した。例えば、生体レベルでは、乳房炎発症直後の乳腺上皮細胞における短期的な変化を調べることは困難である。なぜなら、乳牛の屠殺には時間がかかり、な

おかつ生体の乳腺全体で同時に乳房炎発症直後の変化を誘導できないためである。一方で、細胞膜に局在する膜タンパク質は、数分から数時間で細胞内局在を変化させることが知られている (Adams et al. 2007; Yasui et al. 2008)。そこで、作製した乳分泌モデルを用いて LPS が膜タンパク質の局在や発現量に及ぼす影響を調べ、新たな知見が得られるかを検証した。

2 結果

2.1 ウシ乳腺上皮細胞の乳分泌モデル作製に向けた細胞の足場の検証

乳腺上皮細胞は乾乳期ホルスタイン牛の乳腺片から単離した (図 24A)。まず、細切した乳腺片をコラゲナーゼ処理した後、密度勾配遠心を行うことにより細胞塊を得た (図 24B)。この細胞塊を通常の培養用シャーレに播種し、単層培養すると、細胞塊から乳腺上皮細胞が平面状に増殖し、敷石状の細胞層を形成した (図 24C、D)。この過程で、線維芽細胞や免疫細胞などの非上皮系の細胞は確認されなかったため、乳腺上皮細胞による細胞塊として乳分泌モデルの足場の検証に使用した。

通常の培養用シャーレ、セルカルチャーインサート、およびコラーゲンゲルを被膜したインサート上に細胞塊を播種したところ、いずれの足場においても敷石状の細胞層が形成された。続いて、乳腺上皮細胞層における TJ 形成を調べるため、クローディン-3 およびオクルディンの免疫染色を行った (図 24H)。いずれの足場においても乳腺上皮細胞層はクローディン-3 およびオクルディンに対して陽性反応を示したが、シャーレおよびインサート上の乳腺上皮細胞では、オクルディンで示される TJ が不規則で断片的なネットワーク状に観察された。また、クローディン-3 の局在もオクルディンで示される TJ に観察されたが、一部の細胞では細胞質に局在していた。一方、コラーゲンゲルを被膜したインサート上に播種した乳腺上皮細胞では、オクルディンとクローディン-3 による均整なネットワーク状の構造が細胞間隙の TJ に沿って観察された。以上の結果より、TJ の形成にはコラーゲンゲルを被膜したインサートが適切であると判断し、続いて培地添加物の検証を行った。

2.2 Dex および BPE による乳産生能力の誘導効果

分娩前後のマウス乳腺において、乳腺上皮細胞の乳産生能力はプロラクチンとグルココルチコイドによって誘導される (Kobayashi et al. 2017)。そこで、プロラクチンを豊富に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)

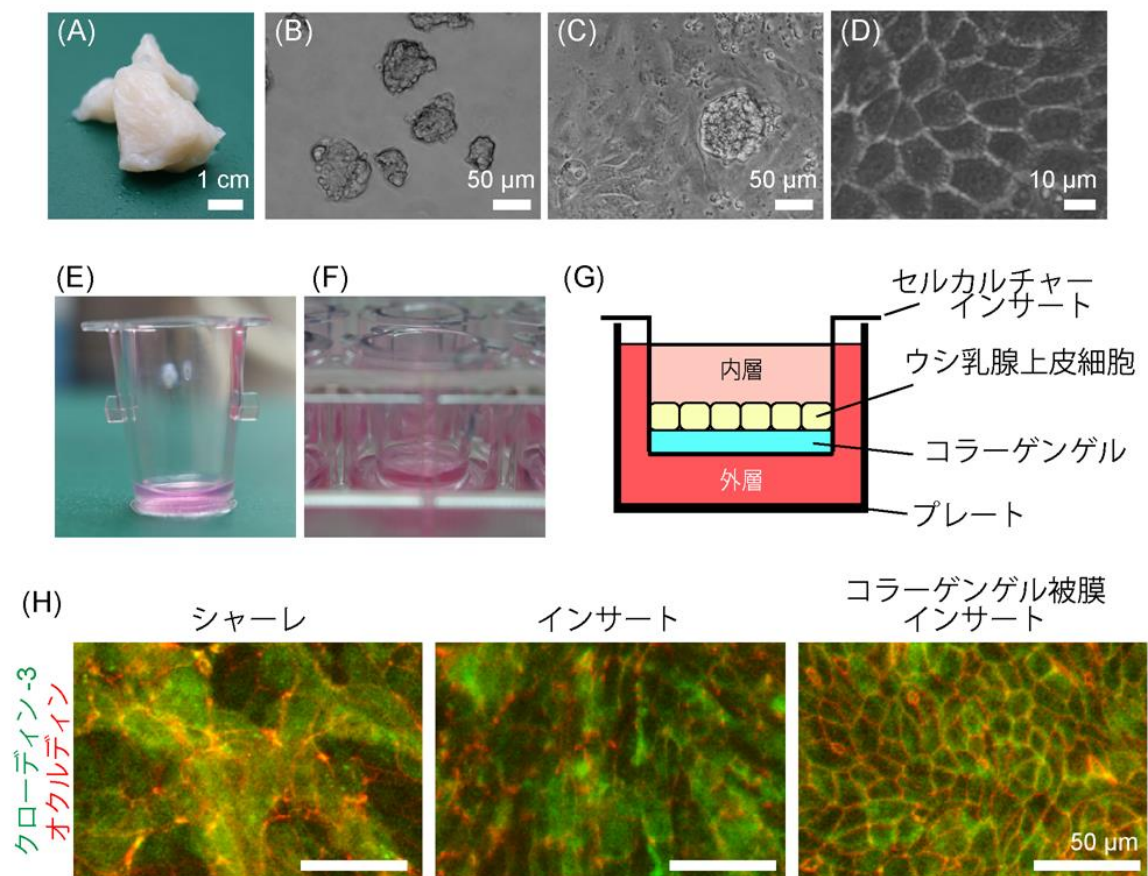


図24 ウシ乳腺上皮細胞の培養モデルに用いる乳腺上皮細胞および細胞の足場の検証

(A) 乾乳期ホルスタイン牛から採取した乳腺片を示す。(B-D) 単離した乳腺上皮細胞塊 (B)、乳腺上皮細胞塊から伸展した乳腺上皮細胞 (C)、およびコンフルエント後に敷石状となった乳腺上皮細胞層を示す (D)。(E-G) コラーゲンゲルを被膜したセルカルチャーインサート (E)、培養の様子 (F)、および培養モデルの模式図を示す (G)。(H) それぞれの足場で培養したウシ乳腺上皮細胞におけるクロードイン-3 (緑) およびオクルディン (赤) の免疫染色像を示す。

が、コラーゲンを被膜したインサート上で培養したウシ乳腺上皮細胞の乳産生能力の誘導に対する効果を検証した。乳腺上皮細胞は Dex および BPE の有無に関わらず敷石状の細胞層を形成していた (図 25A)。免疫染色により β -カゼインの細胞内局在を観察したところ、Dex/BPE 両処理群では大半の細胞で β -カゼインに対する陽性反応を示していた。一方で、Dex/BPE 非処理群では大半の細胞が β -カゼイン陰性であった。Dex 処理群では、いくつかの細胞が β -カゼインに対して弱い陽性反応を示した。BPE 処理群では、大半の細胞が弱い陽性反応を示し、 β -カゼインが細胞質で異常に蓄積した細胞も観察された。

続いて、細胞内およびインサート内層の培地中に分泌された β -カゼイン量およびラクトフェリン量をウェスタンブロッティングにより調べた (図 25B)。非処理群では細胞内 β -カゼインのバンドは弱く検出され、培地中 β -カゼインのバンドは検出されなかった。一方、Dex/BPE 両処理群では細胞内と培地中 β -カゼインのバンドが明瞭に検出された。各バンドのデンストメトリー解析の結果、Dex 単独処理群および BPE 単独処理群における細胞内 β -カゼイン量は、Dex/BPE 両処理群の半分程度であった。また、BPE 処理群では Dex/BPE 両処理群と同程度の培地中 β -カゼインが確認されたが、Dex 処理群ではほとんど検出されなかった。一方、ラクトフェリンは、非処理群においても細胞層と培地中に明瞭なバンドが検出された。Dex/BPE 両処理群では細胞内ラクトフェリン量が非処理群の約 1.2 倍、培地中ラクトフェリン量が約 1.7 倍に増加し、統計的な有意差も確認された。また、BPE 処理群においても培地中ラクトフェリン量が約 1.5 倍に増加していた。Dex 処理群では培地中ラクトフェリン量が約 1.3 倍に増加していたが、非処理群との間に有意差は確認されなかった。

続いて、 β -カゼイン (*CSN2*) およびラクトフェリン (*LF*) の mRNA 発現量を定量 PCR により調べた (図 25C)。Dex/BPE 両処理群における *CSN2* および *LF* は非処理群と比べ、約 15 倍および約 3 倍に増加し、統計的な有意差も確認された。また、BPE 処理群では *CSN2* が約 13 倍に増加し、Dex 処理群および BPE 処理群では *LF* が約 2 倍に増加していたが、

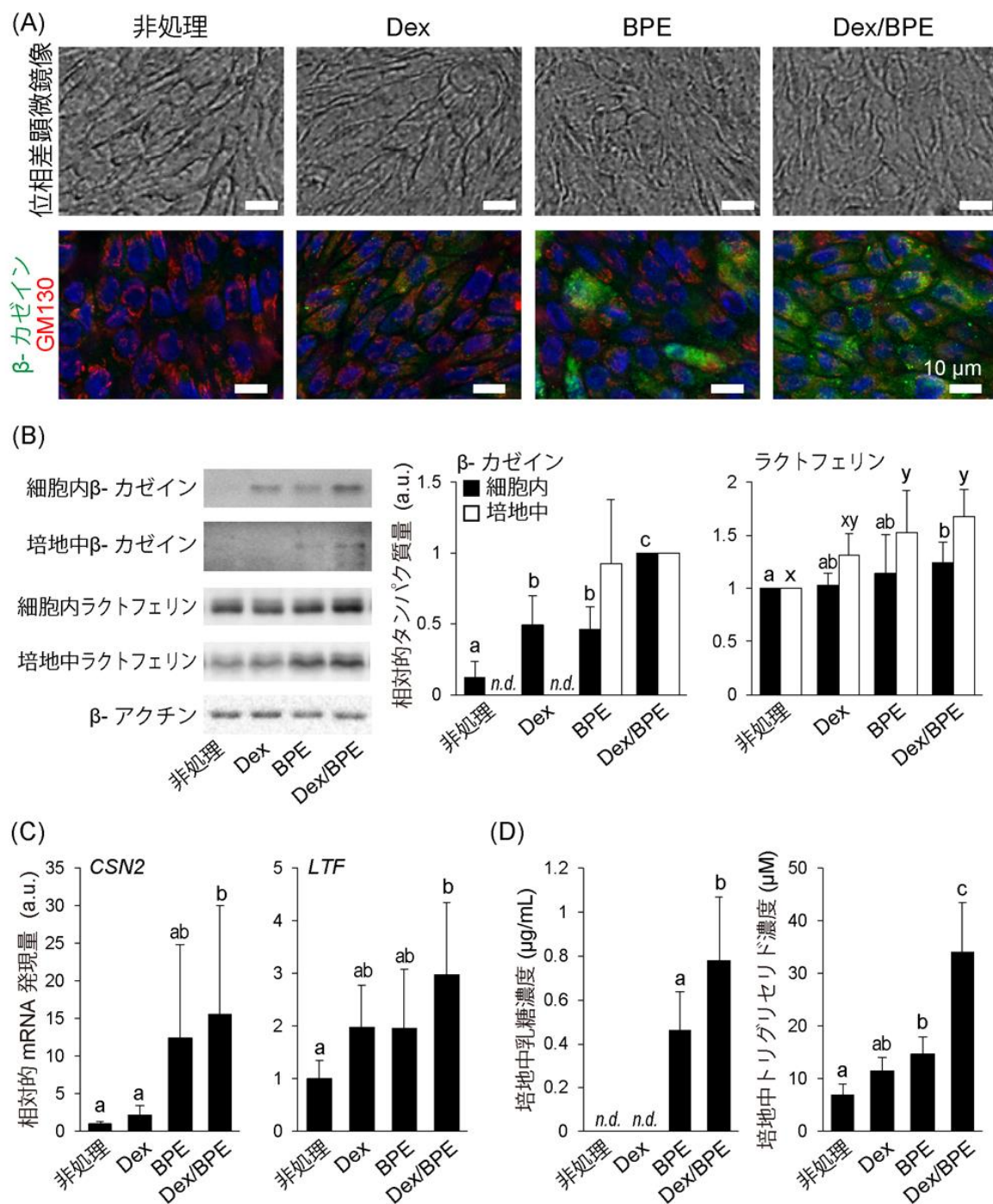


図25 DexおよびBPEがウシ乳腺上皮細胞の乳産生に及ぼす影響

コラーゲンを被膜したインサート上のウシ乳腺上皮細胞をDexおよびBPE存在下で5日間培養した。(A) 代表的な位相差顕微鏡像およびβ-カゼイン(緑)の免疫染色像を示す。なお、赤はGM130(ゴルジ体マーカー)、青はDAPI(細胞核)を示し、スケールバーは10 μmである。(B) 細胞内および培地中のβ-カゼインとラクトフェリンおよびβ-アクチンの代表的なウェスタンブロットティング像を示す。グラフは検出したバンドをデンストメトリー解析し、β-アクチンで標準化したタンパク質量(黒: 細胞内、白: 培地中)を示す。(C) β-カゼイン(CSN2)およびラクトフェリン(LF)のmRNA発現量を示す。(D) 培地中の乳糖濃度およびトリグリセリド濃度を示す。エラーバーは標準偏差を示し、n = 8-12、異符号間に有意差あり(p < 0.05)。

非処理群との間に有意差は確認されなかった。

乳タンパク質産生能力の評価に続いて、インサート内層の培地中に分泌された乳糖とトリグリセリドの濃度を測定した (図 25D)。培地中の乳糖は、非処理群および Dex 処理群では検出されず、BPE 処理群で 0.46 $\mu\text{g/mL}$ 、Dex/BPE 両処理群では 0.78 $\mu\text{g/mL}$ であった。また、培地中のトリグリセリド濃度は、非処理群で 7 μM 、Dex 処理群で 12 μM 、BPE 処理群で 15 μM 、Dex/BPE 両処理群で 34 μM であった。なお、培地中の乳糖濃度とトリグリセリド濃度は BPE 単独処理群と Dex/BPE 両処理群の間に有意差が確認された。

2.3 Dex および BPE による強固な TJ 形成の誘導効果

コラーゲンを被膜したインサート上の乳腺上皮細胞層における経上皮電気抵抗値を測定し、TJ バリア機能に対する Dex および BPE の効果を調べた (図 26)。Dex や BPE で処理する直前 (day 0) の乳腺上皮細胞層はコンフルエント状態であり、その経上皮電気抵抗値は $903.8 \pm 368.1 \Omega \times \text{cm}^2$ を示した。Dex/BPE 非処理群では培養日数とともに抵抗値が増加し、培養 5 日後の値は処理直前の約 2 倍であった。Dex 処理群では、処理直後から抵抗値が増加し、処理 5 日後には処理直前の約 5 倍の値を示した。BPE 処理群および Dex/BPE 両処理群においても培養日数とともに抵抗値が増加していき、処理 5 日後にはそれぞれ約 3 倍、約 4 倍に達していた。

続いて、Dex および BPE を 5 日間処理した乳腺上皮細胞における TJ 構成タンパク質 (クロードイン-1、-3、-4、-7、オクルディン) の発現量をウェスタンブロッティングにより調べた (図 27A)。Dex/BPE 非処理群と比べて、Dex 処理群ではクロードイン-1 および-3 の発現量が有意に増加し、Dex/BPE 両処理群ではクロードイン-1、-3 および-7 の発現量が有意に増加していた。一方、BPE 処理群ではクロードイン-1 の発現量が有意に減少していた。クロードイン-4 およびオクルディンはいずれの処理群においても顕著な量的変化は確認されなかった。また、これらのクロードインサブタイプの経時的な発現量の変化についても調

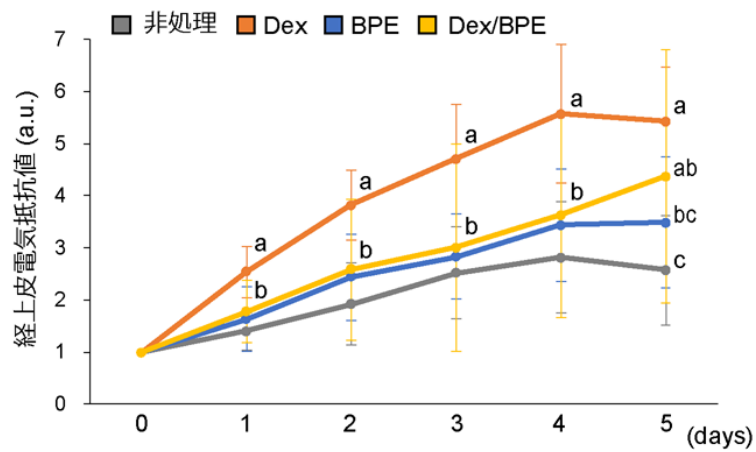


図26 DexおよびBPEがウシ乳腺上皮細胞のTJバリアに及ぼす影響

コラーゲンゲルを被膜したインサート上のウシ乳腺上皮細胞をDexおよびBPE存在下で5日間培養した際の経上皮電気抵抗値の経時的な変化を示す。グラフの縦軸は各群の処理直前 (day 0) を基準とした相対値を示す。なお、エラーバーは標準偏差を示し、n = 8-12、異符号間で有意差あり ($p < 0.05$)。

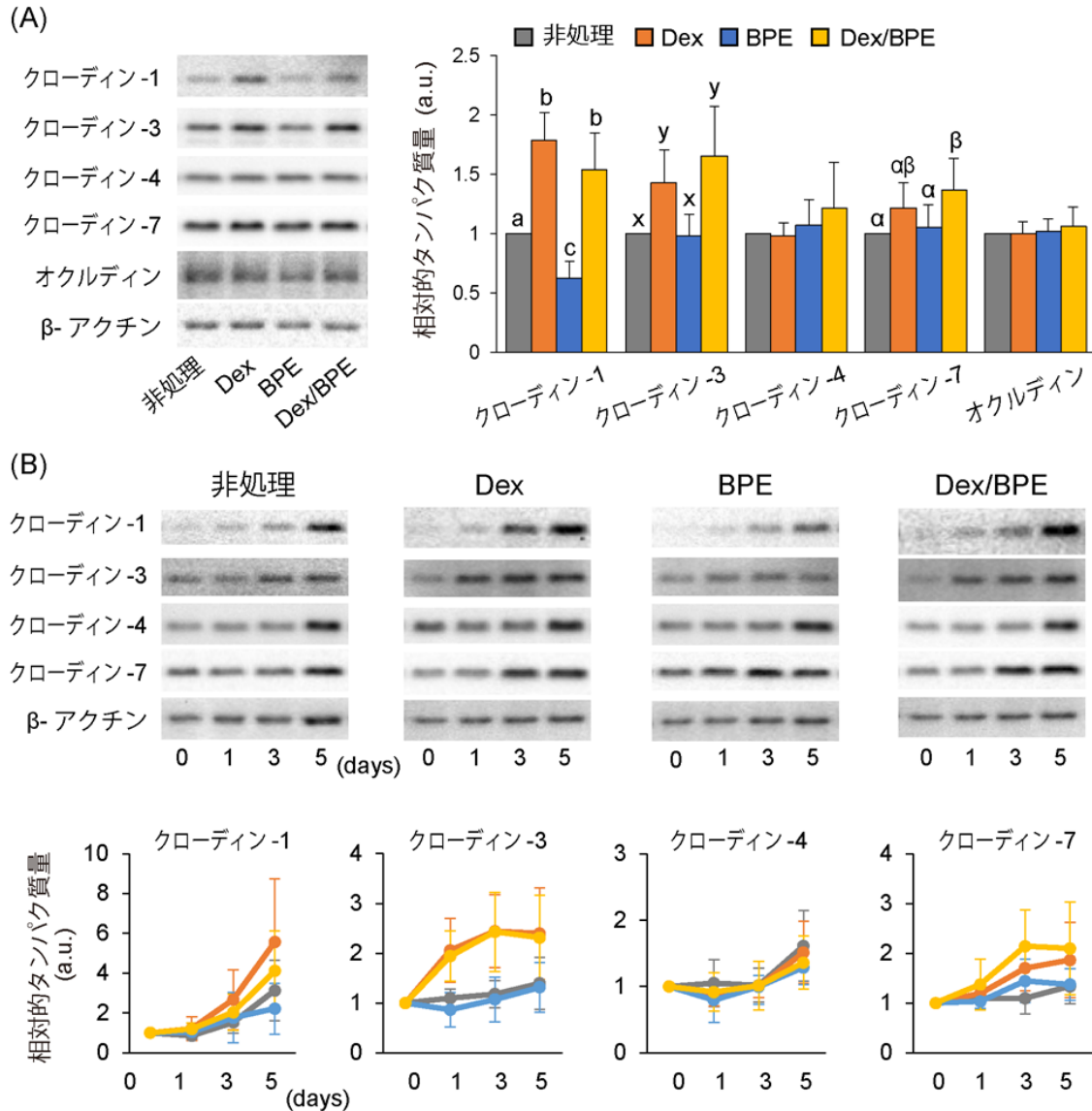


図27 DexおよびBPEがウシ乳腺上皮細胞におけるTJタンパク質の発現量に及ぼす影響

コラーゲンゲルを被膜したインサート上のウシ乳腺上皮細胞をDexおよびBPE存在下で5日間(A)もしくは1-5日間(B)培養した。クローディンサブタイプ、オクルディンおよびβ-アクチンの代表的なウェスタンブロットティング像を示す。グラフは検出したバンドをデンストメトリー解析し、β-アクチンで標準化したタンパク質量(灰：非処理, 橙：Dex, 青：BPE, 黄：Dex/BPE)を示す。縦軸は非処理群を基準とした相対値(A)もしくは処理day 0を基準とした相対値(B)を示す。エラーバーは標準偏差を示し、n=8-12、異符号間に有意差あり(p<0.05)。

べた (図 27B)。クロードイン-1 はいずれの処理群においても培養日数に伴い増加していた。クロードイン-3 および-7 は Dex 処理群と Dex/BPE 両処理群において処理直後から増加していた。クロードイン-4 はいずれの処理群においても処理 3 日後から処理 5 日後にかけて増加していた。

また、免疫染色により Dex/BPE 非処理群と両処理群における各クロードインサブタイプの局在を調べた (図 28)。Dex/BPE 処理の有無に関わらず、オクルディンは側部細胞膜の頭頂部側にある TJ 領域に局在し、クロードイン-1 は細胞質および TJ 領域の一部に局在していた。クロードイン-3 も Dex/BPE 処理に関わらずオクルディンと共局在しており、断面像においても TJ 領域に特異的に局在している様子が観察された。クロードイン-4 は非処理群において細胞質および TJ 領域を含む側部細胞膜に観察されたが、Dex/BPE 両処理群においては TJ 領域にほとんど局在していなかった。クロードイン-7 は Dex/BPE 処理に関わらず TJ 領域を除く側部細胞膜に局在する様子が観察された。

2.4 作製した乳分泌モデルの乳腺上皮細胞における細胞極性

これまでの結果より、コラーゲンを被膜したインサート上に播種し、Dex および BPE 存在下で培養した乳腺上皮細胞は、乳産生能力と TJ バリア機能が高いことが判明した。そこで、この条件で培養した乳腺上皮細胞を乳分泌モデルとして、この培養モデルの細胞極性を評価するため、GLUT1、 β -カゼイン、TLR2 および TLR4 の免疫染色を行った (図 29A)。GLUT1 は側部細胞膜に特異的に局在する様子が観察され、 β -カゼインは頭頂部近傍の細胞質に集中して局在する様子が観察された。TLR2 および TLR4 は頂端部細胞膜とその近傍の細胞質に局在し、側底部細胞膜や底部側の細胞質ではほとんど観察されなかった。続いて、インサート内層および外層の培地に含まれるラクトフェリン量および乳糖濃度を調べた (図 29B)。インサート内層に含まれるラクトフェリン量は外層に含まれるものの、7 倍以上であった。また、インサート内層に含まれる乳糖は $1.03 \mu\text{g/mL}$ であったが、外層の培地で

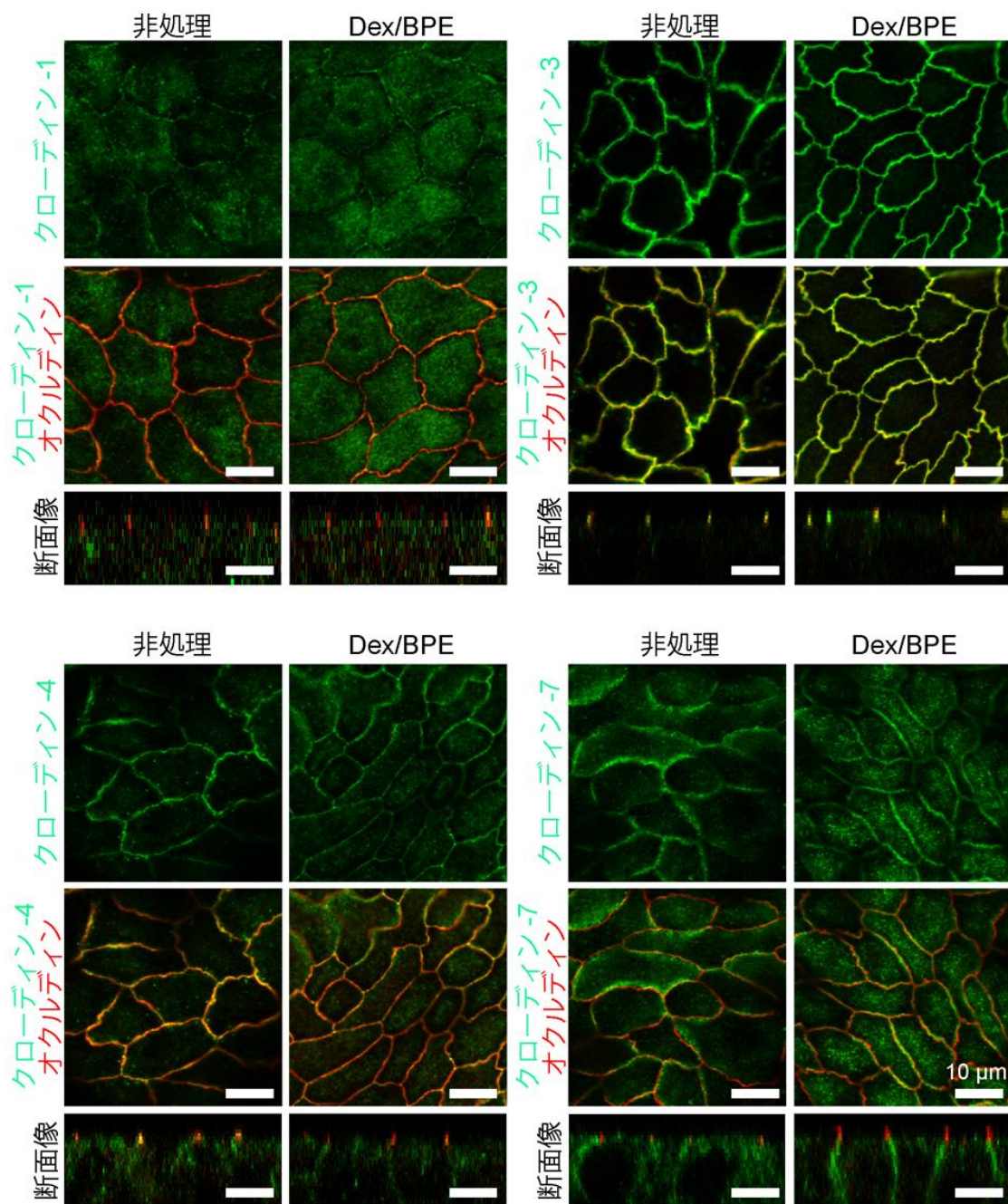


図28 DexおよびBPEがウシ乳腺上皮細胞におけるクローデインの局在に及ぼす影響

コラーゲンを被膜したインサート上のウシ乳腺上皮細胞をDexおよびBPE存在下で5日間培養した。クローデイン-1、-3、-4、-7(緑)の局在を示す。赤はオクルデイン(TJマーカー)を示す。断面像は共焦点顕微鏡で取得したZスタック画像によるZ軸方向の局在を示す。スケールバーは10 μm である。

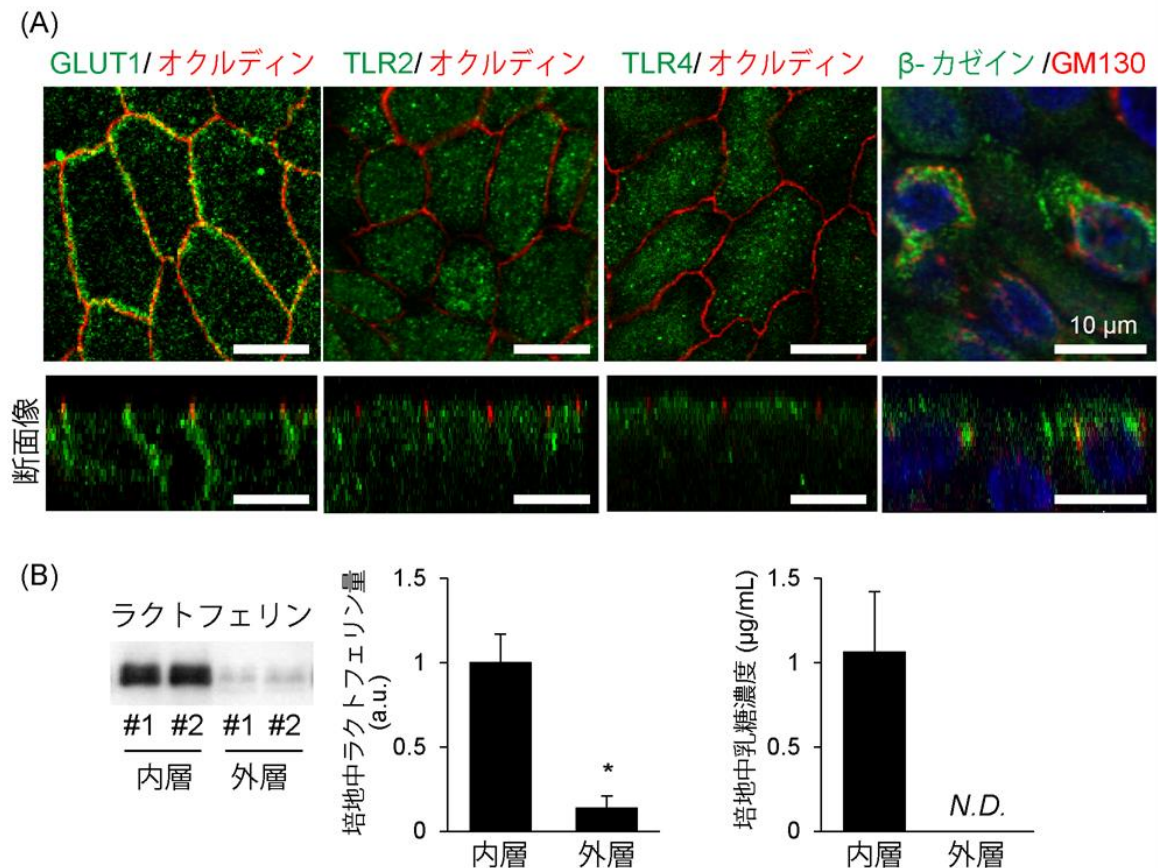


図29 作製した乳分泌モデルにおける乳腺上皮細胞の細胞極性

コラーゲンを被膜したインサート上のウシ乳腺上皮細胞をDexおよびBPE存在下で5日間培養した。(A) GLUT1 (緑)、TLR2 (緑)、TLR4 (緑)、 β -カゼイン (緑)の代表的な免疫染色像を示す。赤はオクルディン (TJマーカー)もしくはGM130 (ゴルジ体マーカー)、青はDAPI (細胞核)を示す。断面像は共焦点顕微鏡で取得したZスタック画像によるZ軸方向の局在を示す。スケールバーは10 μ mである。(B) インサート内層もしくは外層の培地中に含まれるラクトフェリンのウェスタンブロッティング像とそのバンドをデンストメトリー解析したグラフ、および乳糖濃度を示す。エラーバーは標準偏差を示し、 $n = 8-12$ 、 $p < 0.05$ である。

は検出されなかった。以上の結果より、作製した乳分泌モデルの乳腺上皮細胞において膜タンパク質の局在や乳分泌に関する細胞極性が明確になることが明らかになった。

2.5 乳房炎起炎菌毒素が乳分泌モデルの乳産生に及ぼす影響

作製した乳分泌モデルがウシ乳腺上皮細胞の乳産生を *in vitro* で調べる研究に有用であるかを検証するため、乳房炎起炎菌毒素である LPS および LTA が生体同様に乳腺上皮細胞の乳産生能力を低下させるかを調べた。LPS と LTA をそれぞれ最終濃度 1 $\mu\text{g/mL}$ となるようインサート内層の培地に添加し、2 日間培養した後、細胞内およびインサート内層の培地中の β -カゼイン量とラクトフェリン量をウェスタンブロッティングにより調べた (図 30A)。LPS 処理群では培地中 β -カゼイン量がコントロール群の 7 割程度に減少していた。細胞内 β -カゼイン量、細胞内と培地中ラクトフェリン量は LPS 処理による顕著な影響は確認されなかった。一方、LTA 処理群では、細胞内および培地中ラクトフェリン量が 1.2 倍以上に増加していた。細胞内と培地中の β -カゼイン量は LTA 処理による統計的な変化は確認されなかった。続いて、 β -カゼイン (*CSN2*) およびラクトフェリン (*LF*) の mRNA 発現量への影響を定量 PCR により調べた (図 30B)。LPS 処理群では、*CSN2* 発現量がコントロール群の 6 割程度に減少していた。一方、LTA 処理群では *LF* 発現量が約 1.3 倍に増加していた。また、LTA 処理群では *CSN2* 発現量が 7 割程度に減少していたが、統計的な有意差は確認されなかった。続いて、 β -カゼインの細胞内局在を免疫染色により調べた (図 30C)。コントロール群では、大半の細胞が β -カゼイン陽性を示し、ゴルジ体領域 (GM130) に高密度で局在する様子が観察された。コントロール群と同様の局在パターンは LTA 処理群においても観察された。LPS 処理群でも大半の細胞が β -カゼインに陽性反応を示したが、いくつかの細胞では β -カゼインが異常に凝集している様子が観察された。

続いて、細胞内脂肪滴の局在を Nile Red 染色により観察し、脂肪滴の直径を測定した (図 30D、E)。コントロール群では、観察された脂肪滴のうち直径 0.3–1 μm の割合が 89.0%、

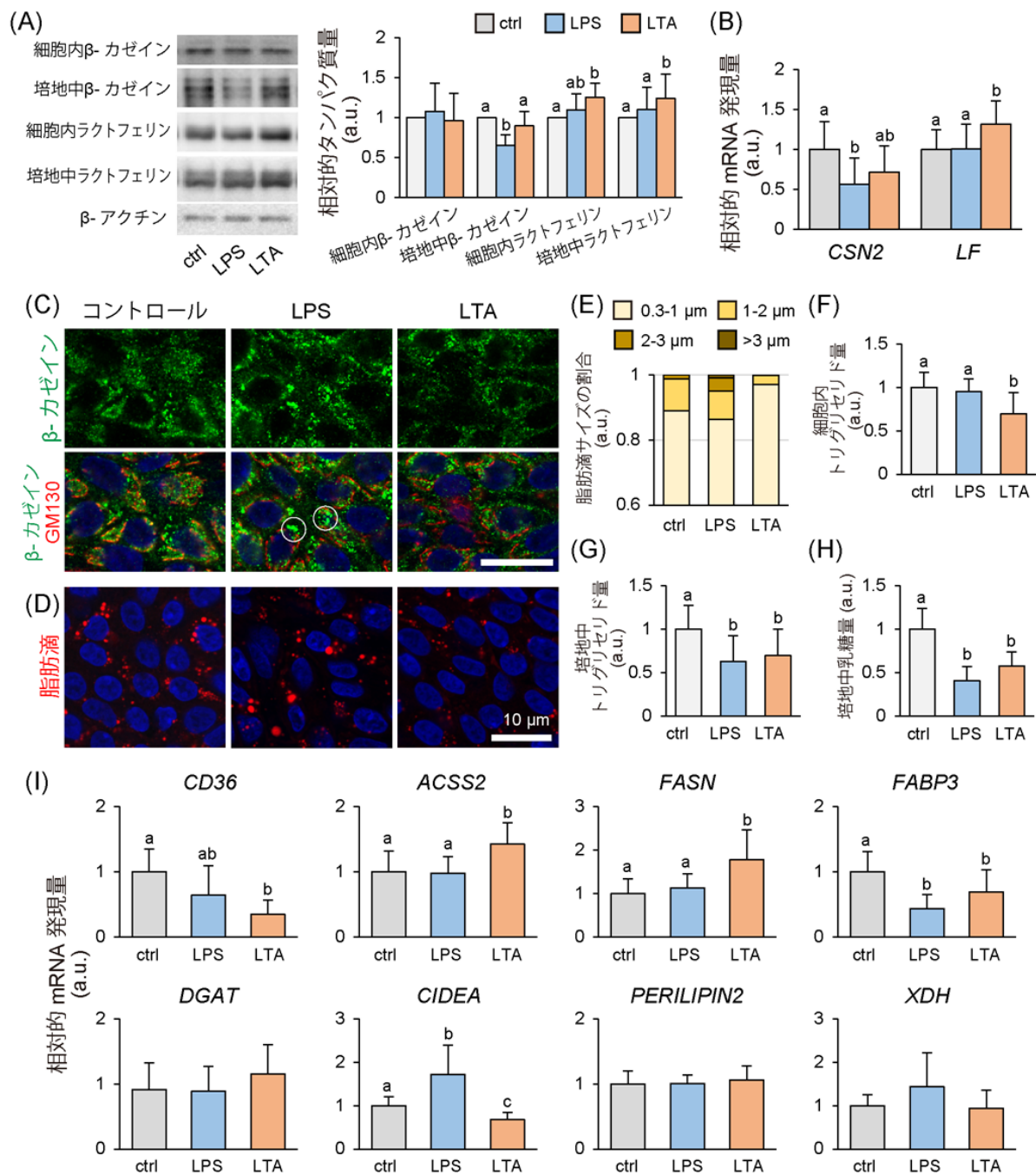


図30 LPSとLTAが乳分泌モデルにおける乳腺上皮細胞の乳産生に及ぼす影響

乳分泌モデルのウシ乳腺上皮細胞をLPSおよびLTA存在下で2日間培養した。(A) 細胞内および培地中のβ-カゼインとラクトフェリンおよびβ-アクチンの代表的なウェスタンブロッティング像を示す。グラフは検出したバンドをデンシトメトリー解析し、β-アクチンで標準化したタンパク質量 (灰：コントロール、青：LPS、橙：LTA) を示す。(B) β-カゼイン (*CSN2*) およびラクトフェリン (*LF*) のmRNA発現量を示す。(C) β-カゼイン (緑) の代表的な免疫染色像を示す。赤はGM130、青はDAPIを示し、白丸はβ-カゼインが異常に凝集した部分を示す。(D, E) ナイルレッド染色による細胞内の脂肪滴の局在および脂肪滴サイズの割合を示す。(F, G) 細胞内および培地中のトリグリセリド量を示す。(H) 培地中の乳糖量を示す。(I) 乳脂質合成関連因子のmRNA発現量を示す。エラーバーは標準偏差を示し、n = 8-12、異符号間に有意差あり (p < 0.05)。スケールバーは10 μmである。

1–2 μm が 9.7%、2–3 μm が 1.2%、3 μm 以上の割合が 0.05%であった。LPS 処理群では、直径 0.3–1 μm の割合が 86.3%、1–2 μm が 8.8%、2–3 μm が 4.0%、3 μm 以上の割合が 0.90%であった。LTA 処理群では、直径 0.3–1 μm の割合が 97.0%、1–2 μm が 2.8%、2–3 μm が 0.1%、3 μm 以上の割合が 0.01%であった。また、細胞内および培地中のトリグリセリド量を測定したところ、LPS 処理群では培地中トリグリセリド量がコントロール群の 6 割程度に減少し (図 30G)、細胞内トリグリセリド量は顕著な影響は確認されなかった (図 30F)。LTA 処理群では、細胞内と培地中トリグリセリド量がともに 7 割程度に減少し、有意差も確認された。一方、インサート内層の培地中に分泌された乳糖を測定したところ、LPS 処理群ではコントロール群の 4 割程度、LTA 処理群では 6 割程度に減少し、有意差も確認された (図 30H)。

さらに、乳脂質産生に関わる分子群の mRNA 発現量への影響を定量 PCR により調べた (図 30I)。LPS 処理群では、長鎖脂肪酸の細胞内輸送を行う *FABP3* がコントロール群と比べ有意に減少し、乳脂肪球融合に関わる *CIDEA* が有意に増加していた。LTA 処理群では長鎖脂肪酸の取り込みに関わる *CD36* が、*FABP3* や *CIDEA* とともに有意に減少し、一方で *de novo* 合成に関与する *ACSS2* と *FASN* は有意に増加していた。また、トリグリセリド合成を行う *DGAT*、乳脂肪球融合に関わる *PERILIPIN2* と *XDH* は LPS 処理や LTA 処理による影響はほとんど確認されなかった。

LPS と LTA が乳産生を上方調節する細胞内シグナル経路の STAT5 と AKT、下方調節する STAT3 へ及ぼす影響をウェスタンブロッティングにより調べた (図 31)。LPS 処理群では活性型である pSTAT5 量がコントロール群の 6 割程度に減少していたが、STAT5 量、pSTAT3 量および STAT3 量は約 1.2 倍に増加していた。LTA 処理群では pSTAT5 量が 8 割程度に減少し、pSTAT3 量が約 1.1 倍に増加していた。一方、pAKT 量および AKT 量に対する顕著な影響は確認されなかった。

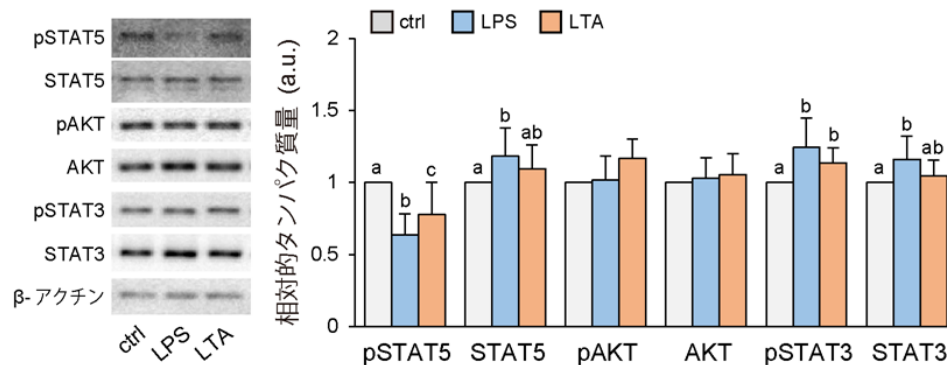


図31 LPSとLTAが乳分泌モデルにおける乳腺上皮細胞の乳産生関連シグナル経路に及ぼす影響

乳分泌モデルのウシ乳腺上皮細胞をLPSおよびLTA存在下で2日間培養した。(A) 細胞内および培地中のpSTAT5, STAT5, pSTAT3, STAT3, pAKT, AKTおよびβ-アクチンの代表的なウェスタンブロットング像を示す。グラフは検出したバンドをデンストメトリー解析し、β-アクチンで標準化したタンパク質量(灰：コントロール、青：LPS、橙：LTA)を示す。エラーバーは標準偏差を示し、n = 8-12、異符号間に有意差あり (p < 0.05)。

2.6 乳房炎起炎菌毒素が乳分泌モデルの TLR シグナルおよび炎症性サイトカイン発現へ及ぼす影響

LPS は TLR4 に感知され、LTA は TLR2 により感知される (Akira et al. 2001)。TLR シグナルは下流の細胞内シグナル経路である NF κ B や MAPK (ERK1/2、p38、JNK)の活性化を介して炎症サイトカインやケモカインの産生を誘導する (Gunther et al. 2012; Gilbert et al. 2013)。これらの炎症反応が乳分泌モデルの乳腺上皮細胞でも起きているかを検証するため、LPS および LTA が NF κ B および MAPK 経路に及ぼす影響をウェスタンブロッティングにより調べた (図 32A)。LPS 処理 1 時間後において、pNF κ B 量および pp38 量がコントロール群に比べてそれぞれ約 1.9 倍、2.3 倍に増加し、pJNK の明瞭なバンドも検出された。LPS 処理 6 時間後では、pNF κ B 量は約 1.7 倍に増加したが、NF κ B 量は 7 割程度に減少していた。LTA 処理 1 時間後では pNF κ B 量がコントロール群の約 1.3 倍に増加したが、LTA 処理 6 時間後では顕著な影響は確認されなかった。また、p38 量、pERK1/2 量、ERK1/2 量および JNK 量は LPS と LTA の 1、6 時間処理による顕著な影響は確認されなかった。

続いて、LPS および LTA の濃度依存的な影響を調べるため、それぞれ 0.1、1、10 μ g/mL の濃度で 1 時間処理を行った (図 32B、C)。LPS 処理群ではいずれの濃度においても pNF κ B 量がコントロール群の 1.5 倍以上、pp38 量が 1.9 倍以上に増加していた (図 32B)。また、LTA 処理群では濃度に関わらず pNF κ B 量が 1.3 倍に増加していたが、NF κ B 量、pp38 量、p38 量には顕著な影響が確認されなかった (図 32C)。

さらに、炎症性サイトカイン (IL1 β 、TNF α 、IL6)およびケモカイン (IL8、CCL5)の mRNA 発現量を定量 PCR により調べた (図 32D)。LPS を 1 μ g/mL で 1 時間処理した乳腺上皮細胞において *IL1B*、*IL8* および *CCL5* が、それぞれコントロール群の 3.5 倍、26 倍、16 倍に増加していた。また、LTA 処理群では *IL1B* および *CCL5* がコントロール群の 2.1 倍、1.3 倍に増加していた。

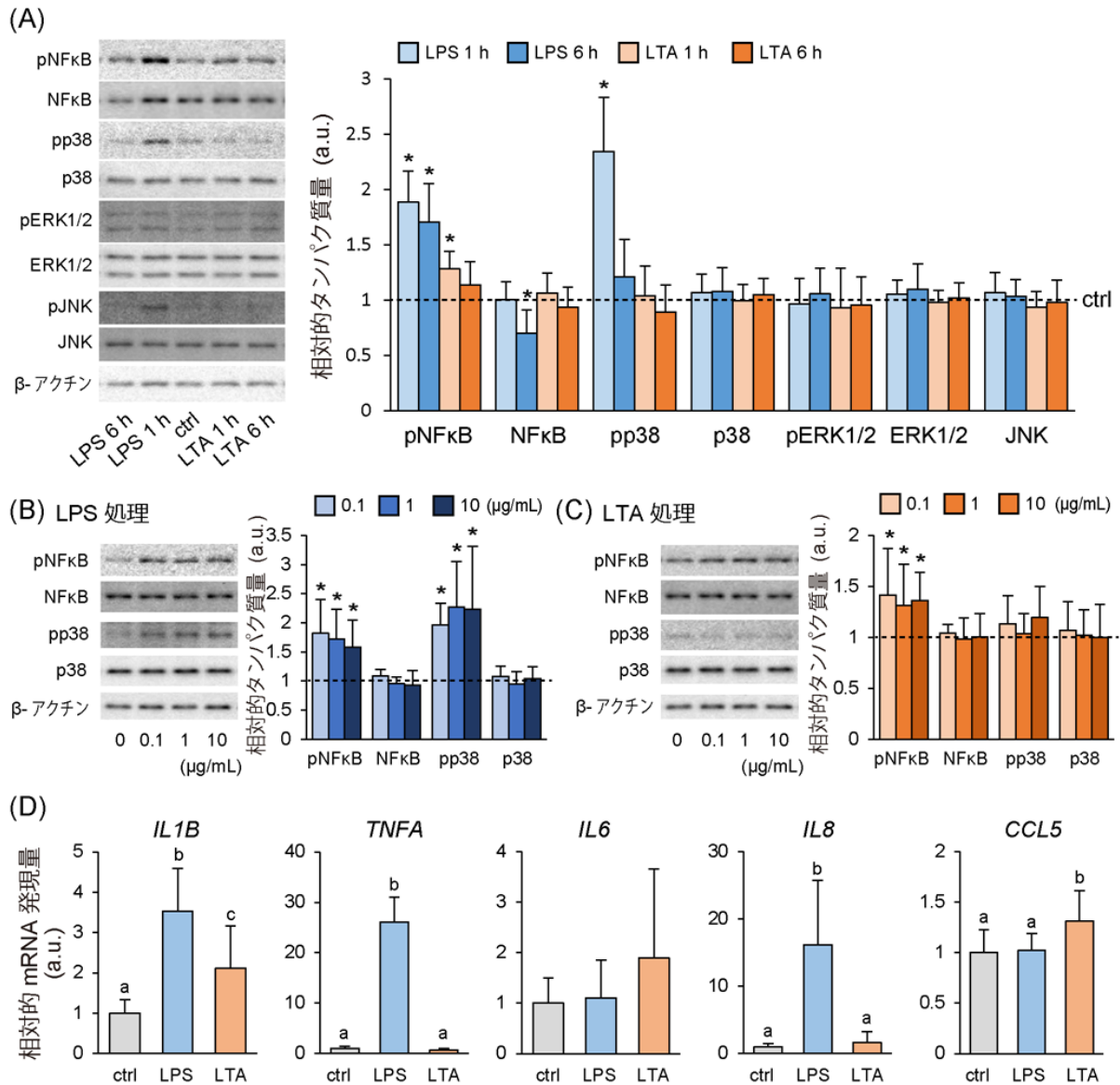


図32 LPSとLTAが乳分泌モデルにおける乳腺上皮細胞のTLRシグナル経路に及ぼす影響

(A) LPSおよびLTA 1 $\mu\text{g/mL}$ 存在下で1-6時間培養したウシ乳腺上皮細胞における各タンパク質の代表的なウェスタンブロッティング像を示す。グラフは検出したバンドをデンストメトリー解析し、 β -アクチンで標準化したタンパク質量(水色: LPS 1時間処理、青: LPS 6時間処理、肌色: LTA 1時間処理、橙: LTA 6時間処理)を示す。それぞれLPS (B)、LTA (C)を0.1、1、10 $\mu\text{g/mL}$ 存在下で1時間培養したウシ乳腺上皮細胞における各タンパク質の代表的なウェスタンブロッティング像およびデンストメトリー解析し、 β -アクチンで標準化したタンパク質量を示す。(D) LPSおよびLTA 1 $\mu\text{g/mL}$ 存在下で培養したウシ乳腺上皮細胞におけるサイトカインおよびケモカインのmRNA発現量を示す。縦軸はコントロール群を基準とした相対値を示す。エラーバーは標準偏差を示し、 $n = 8-12$ 、*および異符号間に有意差あり ($p < 0.05$)。

2.7 炎症性サイトカインとケモカインが乳分泌モデルの乳産生に及ぼす影響

LPS 処理は IL1 β 、TNF α および IL8、LTA 処理は IL1 β と CCL5 の mRNA 発現量をそれぞれ増加させていた。炎症性サイトカインはマウス乳腺上皮細胞の乳産生能力を低下させることが報告されている (Kobayashi et al. 2016a; Matsunaga et al. 2018)。そこで、これらの炎症性サイトカインとケモカインも乳分泌モデルの乳産生を低下させているかを検証するため、それぞれを 1 ng/mL で 2 日間処理し、乳腺上皮細胞の乳産生へ及ぼす影響を調べた (図 33)。IL1 β および IL8 処理群では、pSTAT5 量がコントロール群の 6 割程度に減少していた (図 33A)。また、IL1 β および TNF α 処理群では、pSTAT3 量が約 1.4 倍に増加し、培地中の β -カゼイン量が 6 割程度に減少していた。さらに、インサート内層の培地中に分泌されたトリグリセリド量を測定したところ、IL1 β 処理群ではコントロール群の 7.5 割程度に減少していた (図 33B)。その他のサイトカインやケモカイン処理群においても培地中のトリグリセリド量は 9 割程度に減少していたが、統計的な有意差は確認されなかった。

2.8 LPS が乳分泌モデルにおける乳腺上皮細胞の膜タンパク質に及ぼす影響

作製した乳分泌モデルの乳腺上皮細胞は、LPS 処理によって生体同様に乳産生が阻害され、炎症反応も起きていることが確認された。泌乳期の乳腺上皮細胞では、その細胞膜に局在する様々な膜タンパク質が乳産生や乳房炎起炎菌の感知に関与している。しかし、これらの膜タンパク質の発現パターンが *E. coli* 起因性乳房炎が発症した後、どのように変化しているかはいまだ明らかではない。そこで乳分泌モデルが新規の乳房炎研究に有効であるかを検証するため、LPS が乳腺上皮細胞の膜タンパク質に及ぼす影響を調べた。

まず、泌乳期ウシ乳腺の乳腺上皮細胞において乳産生や乳房炎に関わる膜タンパク質がどのように局在しているかを免疫染色により確認した (図 34)。クロードイン-3 はオクルディンとともに側部細胞膜の頭頂部近傍にある TJ 領域に共局在し (図 34B)、クロードイン-

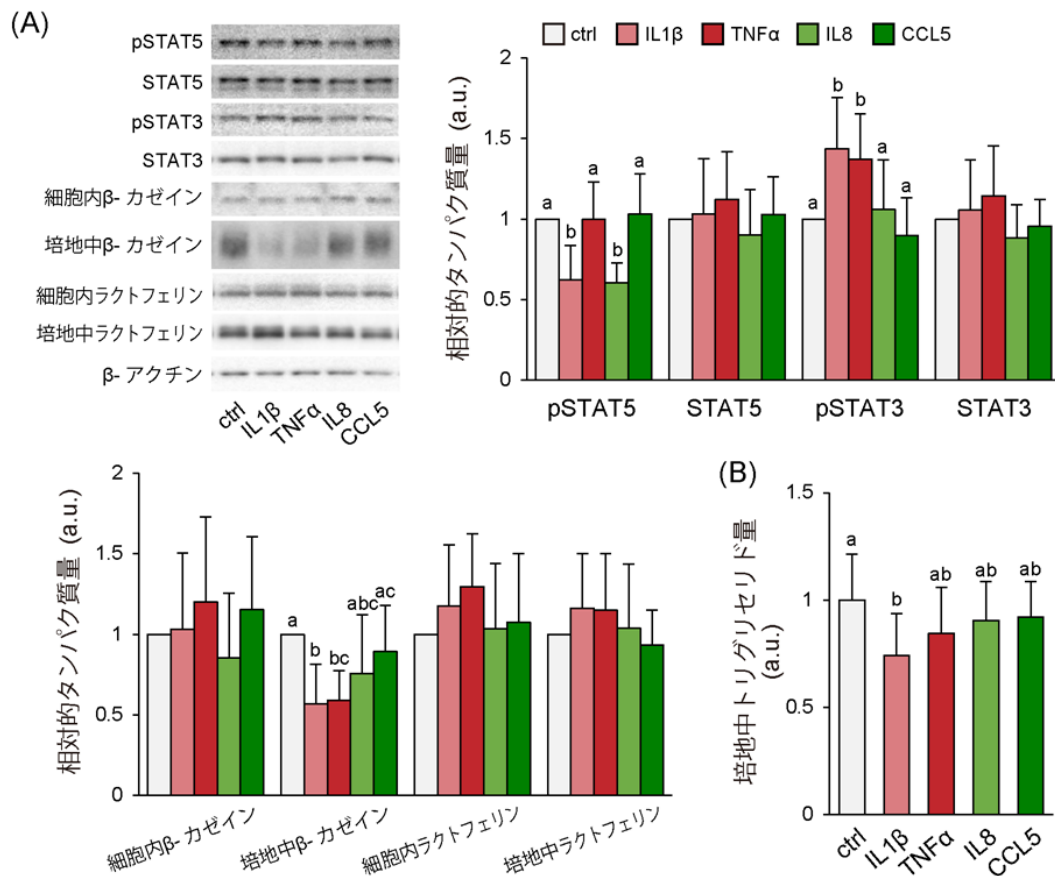


図33 サイトカインとケモカインが乳分泌モデルにおける乳腺上皮細胞の乳産生能力に及ぼす影響

乳分泌モデルのウシ乳腺上皮細胞をそれぞれ1 ng/mLのIL1β、TNFα、IL8、CCL5存在下で2日間培養した。(A) 各タンパク質の代表的なウェスタンブロッティング像を示す。グラフは検出したバンドをデンストメトリー解析し、β-アクチンで標準化したタンパク質量を示す。(B) インサート上層の培地中に分泌されたトリグリセリド量を示す。縦軸はコントロール群を基準とした相対値を示す。エラーバーは標準偏差を示し、n = 8-12、異符号間に有意差あり (p < 0.05)。

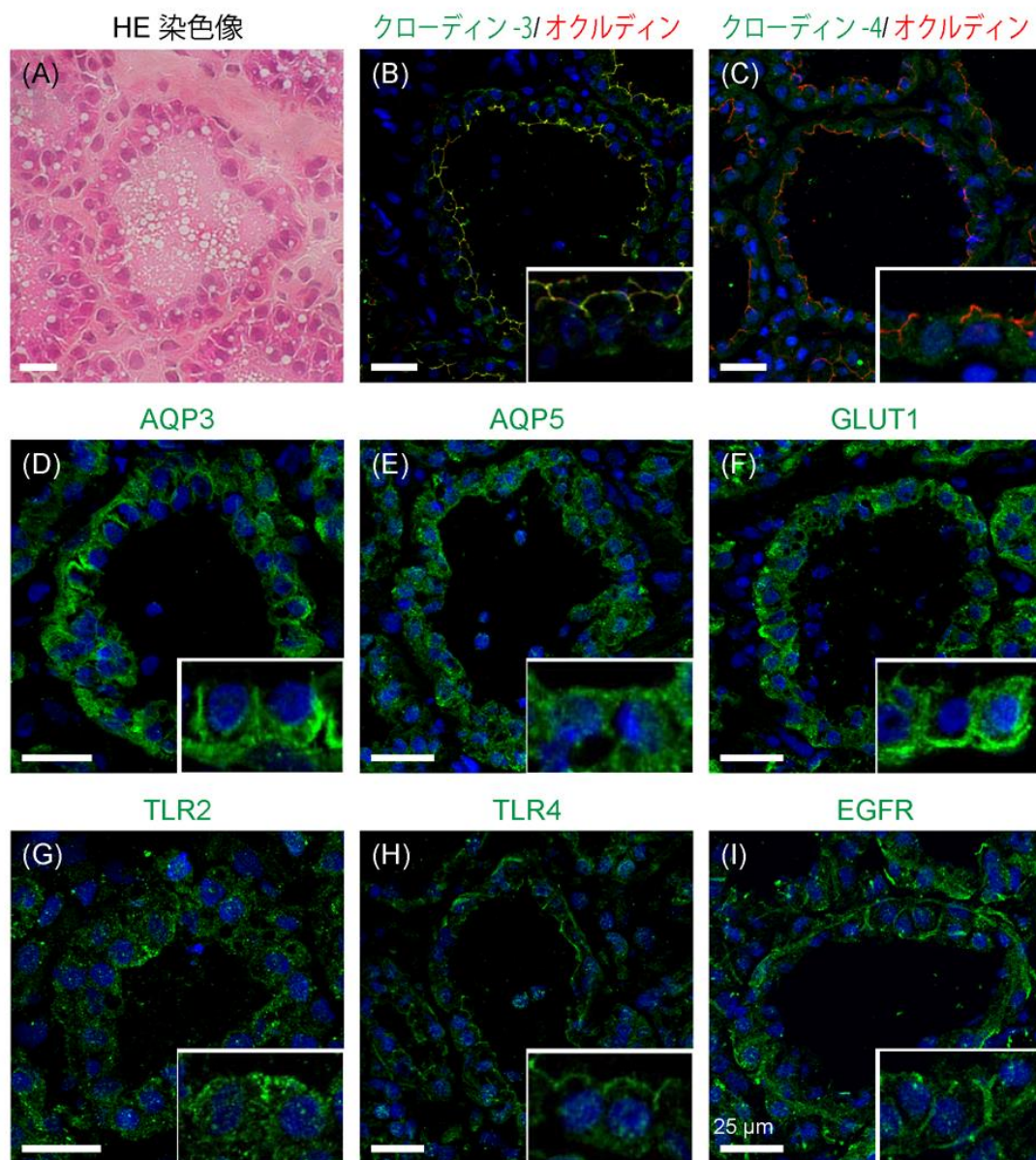


図34 泌乳期ウシ乳腺における膜タンパク質の局在

泌乳期ウシ乳腺における乳腺胞の代表的なHE染色像 (A)およびクローデイン-3 (B)、クローデイン-4 (C)、AQP3 (D)、AQP5 (E)、GLUT1 (F)、TLR2 (G)、TLR4 (H)、EGFR (I)の免疫染色像を示す (緑)。赤はオクルルディンを示す。スケールバーは25 μm である。

4 は主に細胞質で観察され、TJ 領域では観察されなかった (図 34C)。また、AQP3 は側底部細胞膜、AQP5 は頂端部細胞膜および細胞質に局在していた (図 34D、E)。GLUT1 および EGFR は側底部細胞膜に局在している様子が観察された (図 34F、D)。TLR2 および TLR4 は一部の細胞で頂端部細胞膜に局在している様子が観察された (図 34G、H)。これらの膜タンパク質は乳分泌モデルの乳腺上皮細胞においても同様のパターンで局在していることが確認された (図 28、29、35–38)。

続いて、LPS が免疫センサーである TLR2 および TLR4 の発現パターンに及ぼす影響について乳分泌モデルを用いて調べた (図 35)。まず、免疫染色と Biotin-SS-Sulfo-Osu/Avidin D による頂端部細胞膜の染色により、乳腺上皮細胞における TLR2 および TLR4 の局在と頂端部細胞膜の位置関係を調べた。その結果、コントロール群の TLR2 と TLR4 はともに頂端部細胞膜およびその近傍の細胞質に局在していることが確認された (図 35A)。LPS 処理群における TLR2 もコントロール群と同様の局在パターンを示したが、TLR4 は頂端部細胞膜に共局在する様子が強く観察された。

続いて、頂端部細胞膜に存在する膜タンパク質を Biotin-SS-Sulfo-Osu および Streptavidin アガロースを用いて回収し、ウェスタンブロッティングにより TLR2 と TLR4 のバンドを検出した (図 35B)。バンドのデンストメトリー解析の結果、LPS 処理 1 時間後には頂端部細胞膜に存在する TLR4 量がコントロール群と比べて約 1.4 倍に増加し、統計的な有意差も確認された。一方、総 TLR2 量、総 TLR4 量および頂端部細胞膜の TLR2 量は LPS 処理による顕著な影響は確認されなかった。また、LPS 処理 1 時間後における頂端部細胞膜 TLR4 量/総 TLR4 量の割合も有意に増加していた。なお、定量 PCR によって mRNA レベルの発現量も調べたが、LPS 処理 48 時間における TLR2 および TLR4 の mRNA 発現量はコントロール群と同レベルであった (図 35C)。

続いて、LPS がグルコースと水の輸送に関わる GLUT1、AQP3 および AQP5 に及ぼす影響を調べた (図 36)。まず、免疫染色により乳腺上皮細胞におけるこれらの膜タンパク質

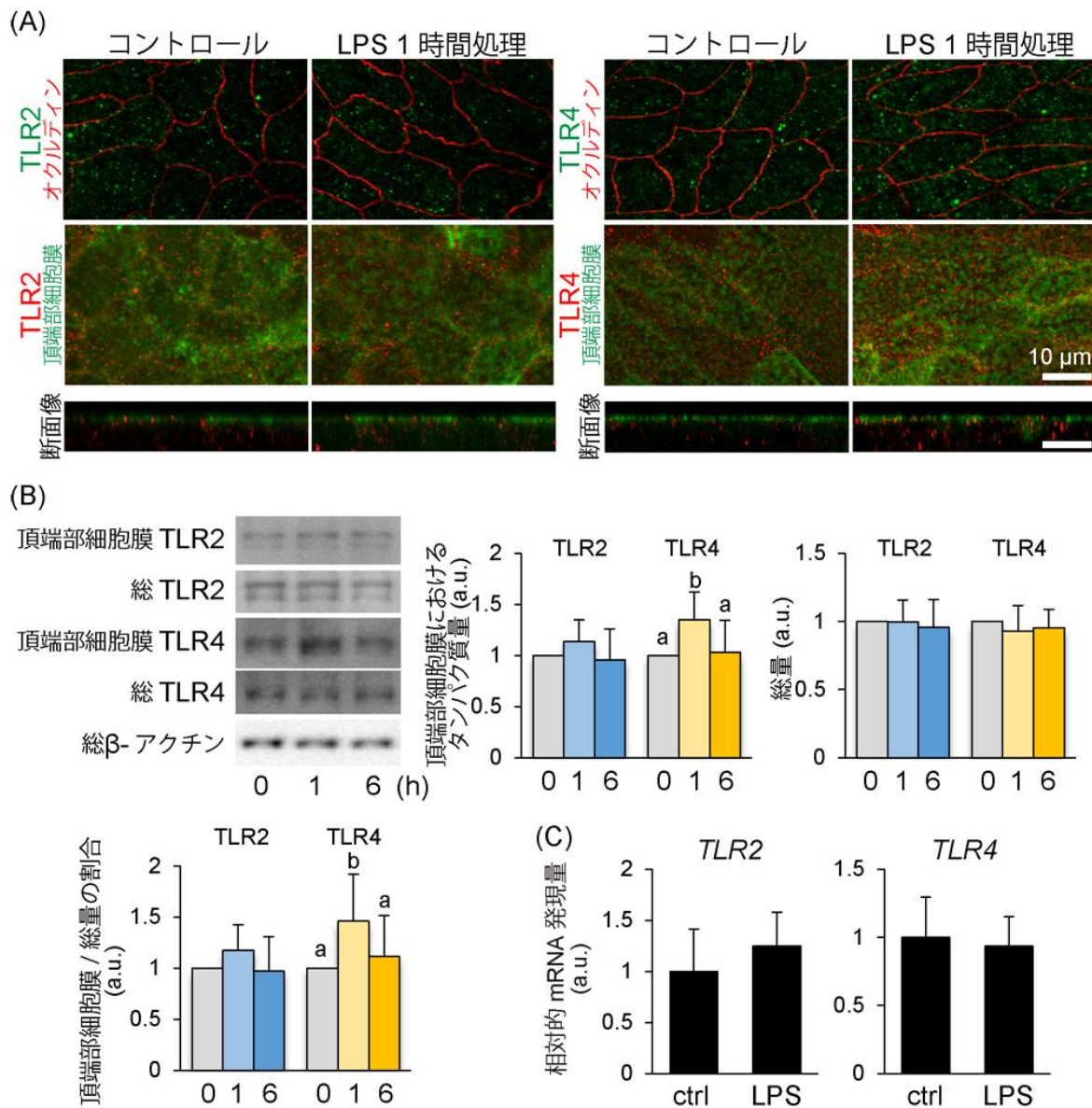


図35 LPSが乳分泌モデルにおけるウシ乳腺上皮細胞のTLR2およびTLR4に及ぼす影響

乳分泌モデルのウシ乳腺上皮細胞を1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS存在下で培養した。(A) LPS処理1時間後におけるTLR2およびTLR4の代表的な免疫染色像を示す。上段はTLR (緑)/オクルディン (赤)、中段と下段はTLR (赤)/頂端部細胞膜 (緑: Biotin-SS-Sulfo-OsuおよびAvidin Dにより標識) と共焦点顕微鏡で取得したZスタック画像によるZ軸方向の局在を示す。スケールバーは10 μm である。(B) LPS処理1-6時間後におけるTLR2、TLR4および β -アクチンの代表的なウェスタンブロットティング像を示す。頂端部細胞膜に存在するタンパク質はBiotin-SS-Sulfo-Osuおよびstreptavidin agarose beadsにより単離した。グラフは検出したバンドをデンストメトリー解析し、 β -アクチンで標準化したタンパク質量を示す。(C) LPS処理48時間後におけるTLR2およびTLR4のmRNA発現量を示す。縦軸はコントロール群を基準とした相対値を示す。エラーバーは標準偏差を示し、 $n = 8-12$ 、異符号間に有意差あり ($p < 0.05$)。

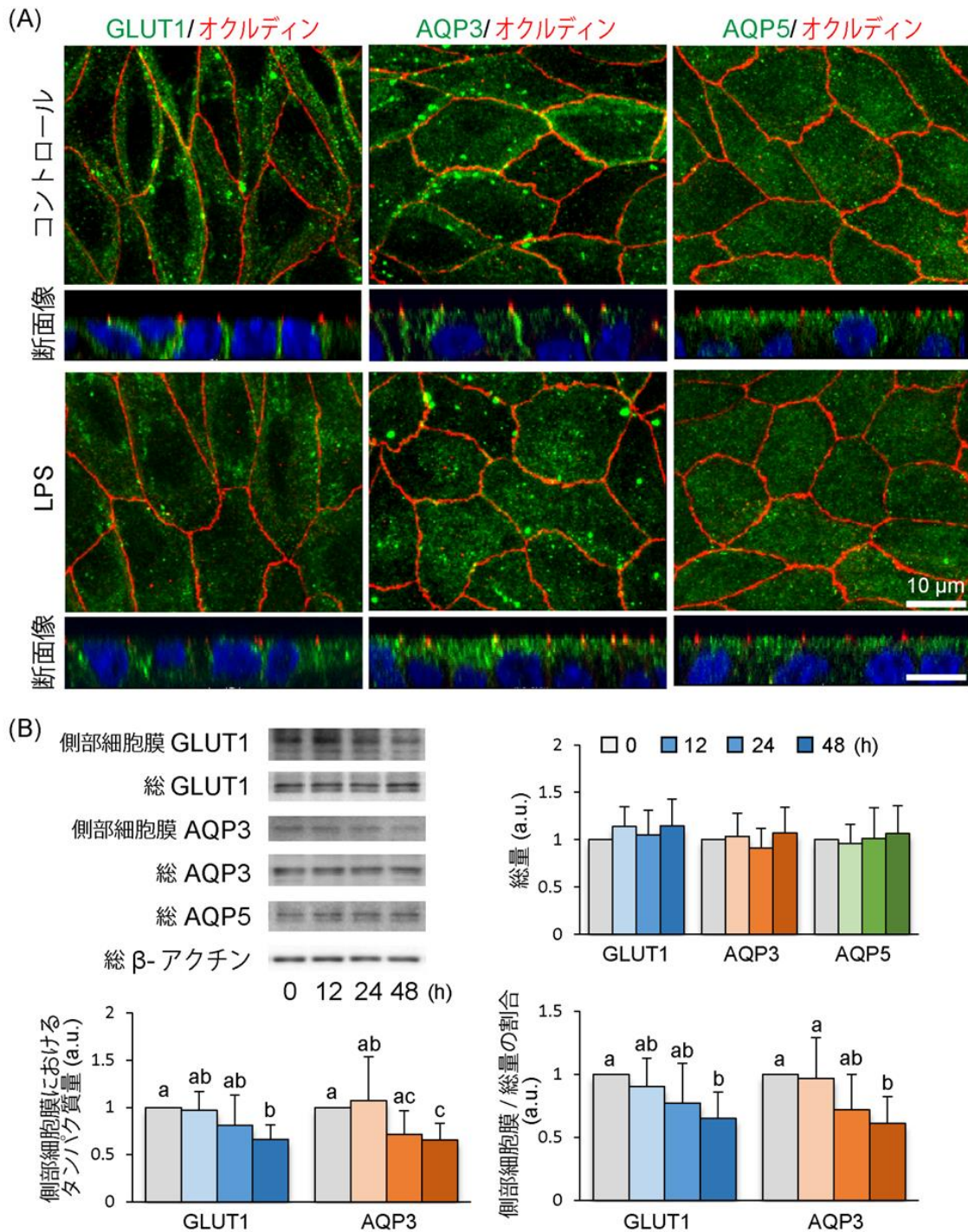


図36 LPSが乳分泌モデルのウシ乳腺上皮細胞のトランスポーターとチャネルに及ぼす影響

乳分泌モデルのウシ乳腺上皮細胞を1 $\mu\text{g/mL}$ LPS存在下で培養した。(A) LPS処理48時間後におけるGLUT1、AQP3およびAQP5(緑)の代表的な免疫染色像を示す。断面像は共焦点顕微鏡で取得したZスタック画像によるZ軸方向の局在を示す。赤はオクルディン、青はDAPIを示し、スケールバーは10 μm である。(B) LPS処理12-48時間後におけるGLUT1、AQP3、AQP5および β -アクチンの代表的なウェスタンブロッティング像を示す。側部細胞膜に存在するタンパク質はBiotin-SS-Sulfo-Osuおよびstreptavidin agarose beadsにより単離した。グラフは検出したバンドをデンストメトリー解析し、 β -アクチンで標準化したタンパク質量を示す。縦軸はコントロール群を基準とした相対値を示す。エラーバーは標準偏差を示し、 $n=8-12$ 、異符号間に有意差あり ($p < 0.05$)。

の局在を観察したところ、コントロール群の GLUT1 および AQP3 は側部細胞膜に、AQP5 は頂端部細胞膜およびその近傍の細胞質に局在していることが確認された (図 36A)。LPS 処理 48 時間後の乳腺上皮細胞では、側部細胞膜における GLUT1 や AQP3 の局在が不明瞭になっている様子が観察され、頂端部細胞膜近傍の細胞質に局在する AQP3 も観察された。AQP5 はコントロール群と同様の局在パターンを示していた。また、Biotin-SS-Sulfo-Osu/Streptavidin アガロースにより側底部細胞膜に存在する GLUT1 および AQP3 を分離し、ウェスタンブロッティングを行った (図 36B)。LPS 処理 48 時間後において側底部細胞膜の GLUT1 と AQP3 の量はコントロール群の 7 割以下に減少し、側底部細胞膜量/総量の割合も低下していた。一方、総 GLUT1 量、総 AQP3 量および総 AQP5 量には顕著な変化は確認されなかった。

LPS が上皮成長因子 (EGF) の受容体、EGFR の発現パターンに及ぼす影響を調べるため、免疫染色を行った (図 37A)。コントロール群では、側部細胞膜に局在する EGFR が観察され、LPS 処理 48 時間後においても同様の局在パターンが観察された。また、定量 PCR により EGFR の mRNA 発現量を調べたところ、有意な変化は確認されなかった (図 37B)。さらに、側底部細胞膜の EGFR 量および EGFR 下流のシグナル経路 (MEK1/2、ERK1/2) への影響をウェスタンブロッティングにより調べたところ、LPS 処理による顕著な影響は確認されなかった (図 37C)。

最後に、LPS が TJ タンパク質とそのバリア機能へ及ぼす影響を調べた (図 38)。免疫染色によりクロードイン-3 とクロードイン-4 の局在を調べたところ、コントロール群のクロードイン-3 はオクルディンと共局在していたが、クロードイン-4 は細胞質および TJ 領域を含む側部細胞膜でわずかに局在する様子が観察された (図 38A)。LPS 処理 48 時間後では、クロードイン-3 は TJ 領域に加えて側部細胞膜にも局在する様子が観察され、クロードイン-4 は側部細胞膜と TJ 領域に局在していた。各 TJ タンパク質の発現量をウェスタンブロッティングにより調べた (図 38B)。LPS 処理 48 時間後において、クロードイン-4 量は

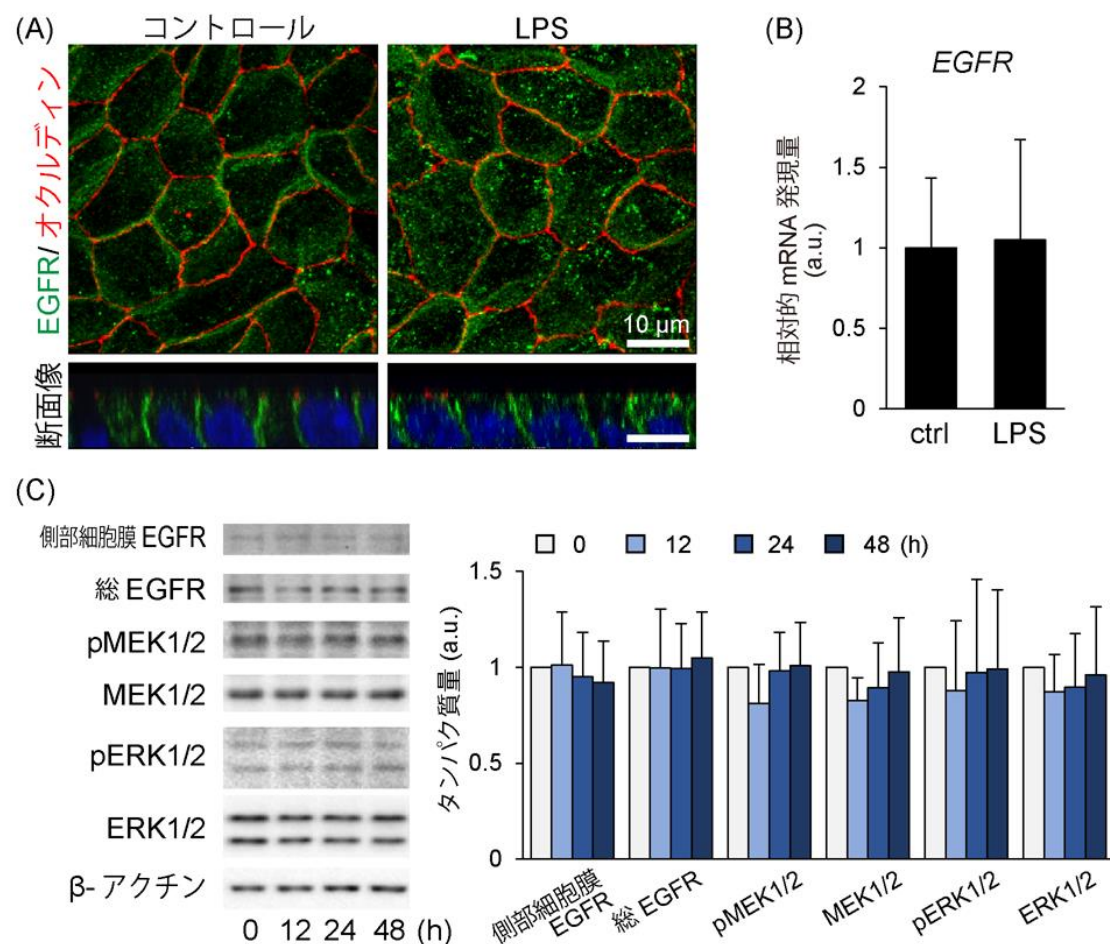


図37 LPSが乳分泌モデルにおけるウシ乳腺上皮細胞のEGFRシグナル経路に及ぼす影響

乳分泌モデルのウシ乳腺上皮細胞を1 μ g/mL LPS存在下で48時間培養した。(A) EGFR (緑)の代表的な免疫染色像を示す。断面像は共焦点顕微鏡で取得したZスタック画像によるZ軸方向の局在を示す。赤はオクルディン、青はDAPIを示す。スケールバーは10 μ mである。(B) EGFRのmRNA発現量を示す。(C) EGFRとその下流のシグナル分子の代表的なウェスタンブロットティング像を示す。側部細胞膜に存在するEGFRはBiotin-SS-Sulfo-Osuおよびstreptavidin agarose beadsにより単離した。グラフは検出したバンドをデンストメトリー解析し、 β -アクチンで標準化したタンパク質量を示す。縦軸はコントロール群を基準とした相対値を示す。エラーバーは標準偏差を示し、n = 8-12である。

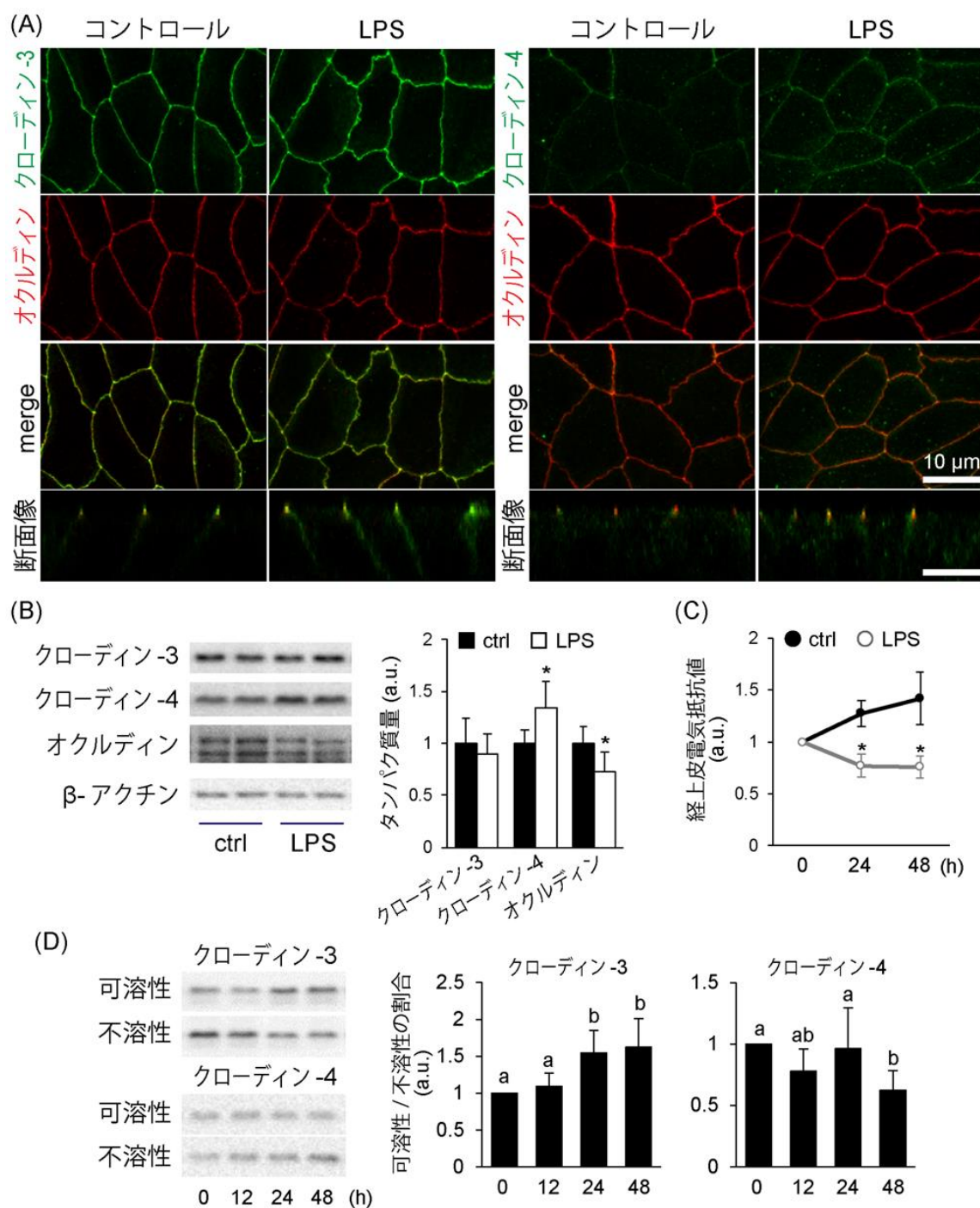


図38 LPSが乳分泌モデルにおけるウシ乳腺上皮細胞のTJに及ぼす影響

乳分泌モデルのウシ乳腺上皮細胞を1 μ g/mL LPS存在下で48時間培養した。(A) クローディン-3 (緑)およびクローディン-4 (緑)の代表的な免疫染色像を示す。断面像は共焦点顕微鏡で取得したZスタック画像によるZ軸方向の局在を示す。赤はオクルディンを示す。スケールバーは10 μ mである。(B) 各タンパク質の代表的なウェスタンブロットティング像を示す。グラフは検出したバンドをデンシトメトリー解析し、 β -アクトリンで標準化したタンパク質量を示す。(C) 経上皮電気抵抗値の経時的な変化を示す。(D) Triton X-100に対する可溶性によりクローディン-3およびクローディン-4を分画した。それぞれのタンパク質量をウェスタンブロットティングおよびデンシトメトリー解析により調べた。グラフの縦軸はコントロールを基準とした相対値 (B, D)および各群0 hを基準とした相対値 (C)を示す。なお、エラーバーは標準偏差を示し、n = 8-12、*および異符号間で有意差あり ($p < 0.05$)。

コントロール群と比べて約 1.3 倍に増加し、オクルディン量は 7.5 割程度に減少していた。また、クローディン-3 量は LPS 処理による顕著な影響は確認されなかった。続いて、LPS 処理による TJ バリア機能への影響を調べるため、経上皮電気抵抗値を測定した (図 38C)。処理直前 (day 0) の電気抵抗値は $1736.4 \pm 352.7 \, \Omega \times \text{cm}^2$ であり、48 時間後のコントロール群では処理直前の約 1.5 倍の抵抗値を示した。一方、LPS 処理群では 24 時間後には処理直前よりも経上皮電気抵抗値は減少し、48 時間後ではコントロール群の 6 割程度に減少していた。また、クローディンの細胞内局在を生化学的に調べるため、乳腺上皮細胞を Triton X-100 可溶性画分と不溶性画分に分画し、ウェスタンブロッティングにより調べた (図 38D)。なお、Triton X-100 可溶画分は細胞質および側底部細胞膜に含まれるクローディンを含み、Triton X-100 不溶画分は TJ 領域のクローディンを含む (Kobayashi et al. 2010)。LPS 処理 48 時間後においてクローディン-3 の Triton X-100 不溶性画分に対する可溶性画分の割合はコントロール群の約 1.6 倍に増加し、クローディン-4 は約 6 割に減少していた。

3 考察

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 (Sakamoto et al. 2005; Zhao et al. 2010; Xu et al. 2018)。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 (Anderson et al. 2007; Truchet and Ollivier-Bousquet 2009)。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 (Cereijido et al. 1998; Shin et al. 2006)。本章では、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、本章では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 BPE とグルココルチコイド類似物である 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 (Watson and Burdon 1996; Wyszomierski et al. 1999; Bertucci et al. 2010; Kobayashi et al. 2016b)。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ードイン-3 とオクルディンによる物質透過性の低い TJ を形成した (Blanchard et al. 2006; Kobayashi and Kumura 2011)。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 (Furuse et al. 1993; McCarthy et al. 1996; Tsukita and Furuse 2000a, b)。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 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分け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、LPS および 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 (Akira et al. 2001; Hertl et al. 2011)。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 (Kawai and Akira 2006)。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 (Singh et al. 2016)。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 (Kobayashi et al. 2013)。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 (Grohn et al. 2004; Jensen et al. 2013)。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

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。以上のことより、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。

LPS と LTA はそれぞれ乳腺上皮細胞の TLR4 と TLR2 に結合し、下流の NF κ B や MAPK (p38、JNK)などの細胞内シグナル経路を活性化させ、サイトカインやケモカインなどの産生を誘導する (Gunther et al. 2012; Gilbert et al. 2013)。本章の乳分泌モデルの実験においても、LPS は NF κ B、p38 および JNK を活性化し、LTA は NF κ B を活性化していた。また、LPS は IL1 β 、TNF α および IL8、LTA は IL1 β および CCL5 の mRNA 発現量を増加させていた。ウシ乳腺に *E. coli* を投与した乳房炎の実験では、乳中体細胞数の急増とともに TNF α および IL8 の発現が亢進するが、*S. aureus* 投与の実験ではほとんど観察されないことが報告されている (Bannerman et al. 2004; Yang et al. 2008)。IL8 はケモカインとして、好中球の遊走を誘起することが知られており (Bannerman 2009)、乳房炎時には乳中に好中球が増加し、体細胞全体の 70%程度を好中球が占める (Ezzat et al. 2014)。また、サイトカインやケモカインが乳腺上皮細胞における乳産生に及ぼす影響を調べたところ、IL1 β は STAT5 不活性化、STAT3 活性化とともに β -カゼインやトリグリセリドの分泌を抑制していた。TNF α も STAT3 活性化とともに β カゼインの分泌を抑制し、IL8 も STAT3 を活性化させていた。先行研究より、IL1 β は STAT5 不活性化、STAT3 活性化とともにトリグリセリドの分泌を抑制することや TNF α により STAT3 経路が活性化することが報告されている (Snyder et al. 2014; Matsunaga et al. 2018)。したがって、乳分泌モデルの乳腺上皮細胞は生体同様に、LPS や LTA による外部刺激に対して下流のシグナル経路を活性化させ、サイトカインやケモカインの発現を亢進させることによって乳腺上皮細胞の乳産生能力を間接的に低下させることが確認された。以上より、本乳分泌モデルにおける乳腺上皮細胞は、LPS/TLR4 シグナルおよび LTA/TLR2 シグナルによる炎症反応を生体同様に再現する、生体反映性の高い乳分泌モデルであると判断された。

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。まず、LPS 受容体である TLR4 の挙動を調べたところ、LPS 処理 1 時間後において頂端部細胞膜に局在する TLR4 量が増加することが明らかになった。一方、TLR4 総量や mRNA 発現量には顕著な影響は確認されず、LPS 処理 6 時間後にはコントロール群との統計的な有意差は認められなくなった。妊娠期の羊膜上皮細胞において、TLR4 は LPS 刺激を受けて 1-2 時間後に一時的に頂端部細胞膜へ移行する (Adams et al. 2007)。また、LPS 処理を施した肺上皮細胞では TLR4 が脂質ラフトに移行することが報告されている (Abate et al. 2010)。そのため、LPS に反応した乳腺上皮細胞においても、細胞質の TLR4 が一過性に頂端部細胞膜に移行すると考えられる。一方、*S. aureus* 由来の LTA を感知する TLR2 では、LPS 刺激による細胞内局在や発現量に顕著な影響は観察されなかった。したがって、TLR4 は *E. coli* 起因性乳房炎の LPS に対して特異的に応答していることが示唆された。

また、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 (Matsuzaki et al. 2005; Yu et al. 2013)。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 (Gross et al. 2015)。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い。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 (Riskin et al. 2008)、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 (Yasui et al. 2008)。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 (Zhao and Keating 2007)、Camp らによって 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 (Camps et al. 1994)。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 (Rodriguez et al. 2019)。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。

泌乳期の乳腺上皮細胞ではクロードイン-3 の密なストランド構造により透過性の低い強い TJ バリアが形成される (Ludewig 1996; Baumgartner et al. 2017)。ウシ乳腺への LPS 投与により TJ タンパク質の発現量が変化し、TJ バリア機能が低下することによって血液成分と乳成分が漏出する (Johnzon et al. 2018; Wang et al. 2019)。しかし、LPS がどのようにウシ乳腺上皮細胞の TJ バリアを弱めているのかを *in vitro* で調べた例はほとんどない。そこで培養モデルを用いて調べた結果、LPS 存在下でクロードイン-4 量が増加し、オクルディン量が減少することが明らかになった。また、界面活性剤を用いた生化学的検証や免疫染色による組織学的検証により、LPS 処理時間に応じてクロードイン-3 は TJ 領域から減少し、一方で TJ 領域のクロードイン-4 は増加することも明らかになった。さらに、TJ バリア機能も LPS 処理により低下していた。以上の結果より、クロードイン-3、-4 とオクルディンの発現量と細胞内局在は LPS によってそれぞれ変化し、TJ バリア機能を低下させることが示された。一方、LPS 処理した乳腺上皮細胞においても、EGFR や TLR4 はそれぞれ側底部細胞膜と頭頂部細胞膜に特異的に局在し続けていた。細胞膜を貫通する構造物である TJ は細胞膜を頂端部側と側底部側に区切り、膜タンパク質の局在を保ち、細胞極性を維持している (Cereijido et al. 1998; Shin et al. 2006)。本研究の結果、LPS 処理した乳腺上皮細胞において、TJ バリア機能は脆弱化するが、細胞膜を区画化する能力は維持されていることも判明した。

本章ではウシ乳腺上皮細胞を用いた乳分泌モデルの作製を試みた。その結果、コラーゲンゲルを被膜したインサート上にウシ乳腺上皮細胞を播種し、BPE および Dex 存在下で培養することによって、生体同様に乳産生能力と TJ バリアを有する培養モデルの作製に成功した。また、作製した乳分泌モデルでは TJ によって頂端部細胞膜と側底部細胞膜が区画されており、乳成分が頂端部側から分泌されていることも確認された。続いて、作製した乳分泌モデルの外部刺激に対する応答性も生体と同様であるかを検証するため、乳房炎起炎菌毒素である LPS と LTA の添加実験を行ったところ、乳腺上皮細胞の乳産生低下と炎症反応が細胞内シグナル経路レベルで生体同様に引き起こされていることが確認された。さらに、LPS が乳産生に関わる膜タンパク質の細胞内局在にも影響を及ぼすことも新たに明らかとなった。以上より、本章で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* で調べるモデルとして有効であると判断された。そこで次章では、この培養モデルを用い、各植物エストロゲンがウシ乳腺上皮細胞の乳産生能力に及ぼす影響を検証することとした。

第四章 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

1 序文

マメ科牧草や大豆粕を摂取した乳牛では、植物エストロゲンの血中濃度が上昇する (Cools et al. 2014)。しかし、植物エストロゲンの種類や含量は植物の種類や部位によって異なり、摂取した植物エストロゲンは体内で代謝変換される。そのため、血液中には複数の植物エストロゲンが同時に存在する。第二章より、マウス乳腺上皮細胞の乳産生に対して、植物エストロゲンは種類依存的に作用し、促進的にも阻害的にも影響を及ぼすことが明らかになった。しかし、マウスは雑食性で単胃動物、ウシは草食性で反芻動物であることから消化管内のイソフラボン代謝細菌も異なる。そのため、マウスとウシでは日常的に血液中に含有する植物エストロゲンの種類や量が異なり、マウス由来乳腺上皮細胞とウシ由来乳腺上皮細胞では植物エストロゲンに対する感受性が異なるかもしれない。

また、個体レベルでウシ乳腺の乳生産性を考える際には、乳腺上皮細胞の乳産生能力のみならず、乳腺上皮細胞の増殖活性と生存率も重要である。なぜなら、泌乳期乳腺における乳産生量は、乳腺上皮細胞の総数と各細胞の乳産生能力の乗数で決定されるからである (Fernandez-Ballart et al. 1989; Hooper et al. 2020)。マウスとウシでは乳腺発達の期間や泌乳期間が異なる (Rowson et al. 2012)。ウシ乳腺では長い泌乳期間を通して乳腺上皮細胞数を維持するため、泌乳期においても乳腺上皮細胞は増殖している (Sorensen et al. 2006)。一方、マウスの乳腺上皮細胞は泌乳期においてほとんど増殖しない (2015 年 筒井、未発表データ)。そのため、乳腺上皮細胞の生存性と増殖性、あるいはその調節シグナルである AKT-mTOR 経路や ERK1/2 経路に対して植物エストロゲンが及ぼす影響もウシとマウスで異なることが予想される。

前章において、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、作製し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、本章では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、第二章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。

2 結果

2.1 植物エストロゲンがウシ乳腺上皮細胞の増殖性および生存性に及ぼす影響

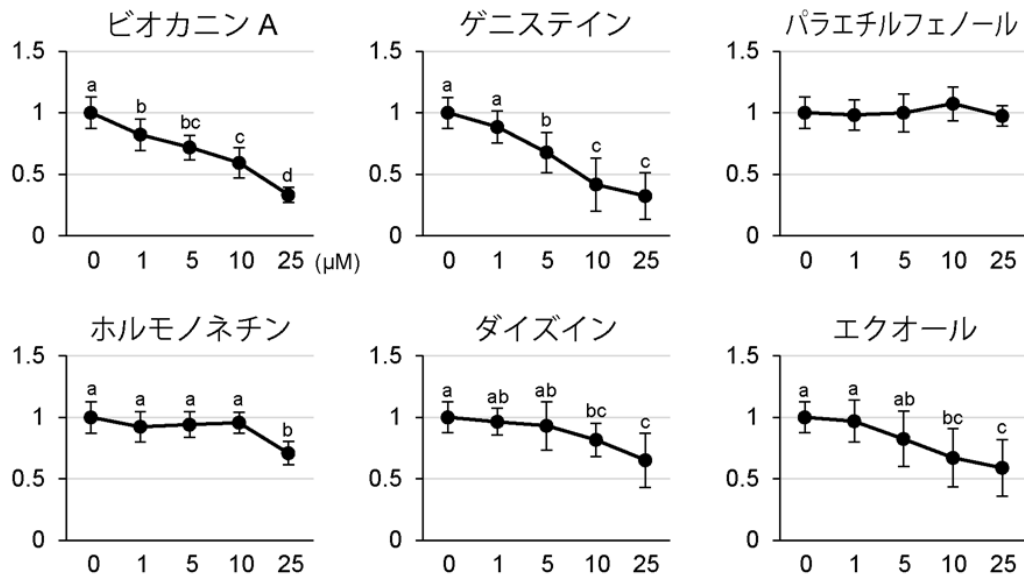
植物エストロゲンがウシ乳腺上皮細胞の増殖性に及ぼす影響を種類別に調べるため、低密度で播種した乳腺上皮細胞を 1、5、10、25 μM の各植物エストロゲン存在下で 5.5 日間培養した後、WST8 を用いて細胞増殖性を評価した (図 39A)。ビオカニン A 処理群およびゲニステイン処理群では、濃度依存的に細胞増殖性が低下し、25 μM 処理ではコントロール群の 4 割以下であった。ダイズイン処理群およびエクオール処理群においても、濃度依存的に細胞増殖性が低下し、25 μM 処理ではコントロール群の 6 割程度であった。ホルモネチン処理群では 10 μM 以下では細胞増殖性はほとんど変化が認められなかったが、25 μM 処理においては細胞数が 7 割程度に減少していた。一方、パラエチルフェノール処理群ではいずれの濃度においても細胞増殖性に顕著な変化は確認されなかった。

続いて、植物エストロゲンがウシ乳腺上皮細胞の生存性に及ぼす影響を種類別に調べるため、コンフルエントに到達した乳腺上皮細胞を各植物エストロゲン存在下で 2 日間培養した (図 39B)。ビオカニン A 処理群およびゲニステイン処理群では、25 μM 処理において細胞数がコントロール群の 9 割程度に減少していた。一方、その他の植物エストロゲンではいずれの濃度においても細胞生存性に対する顕著な影響は確認されなかった。

2.2 植物エストロゲンが AKT-mTOR 経路および ERK1/2 経路に及ぼす影響

植物エストロゲンが細胞増殖性や生存性に関わるシグナル経路に及ぼす影響を種類別に調べるため、サブコンフルエント後から 1 日間、各植物エストロゲン存在下で培養を行い、AKT、ERK1/2、および mTOR の発現量とそのリン酸化レベルをウェスタンブロッティングにより調べた (図 40)。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処理群において pAKT 量が濃度依存的に減少していた。また、pAKT の減少量は植物エストロゲンの種類によって異なり、ビオカニン A 処理群およびダイズイン処理群では 25 μM 処理にお

(A) 細胞増殖性



(B) 細胞生存性

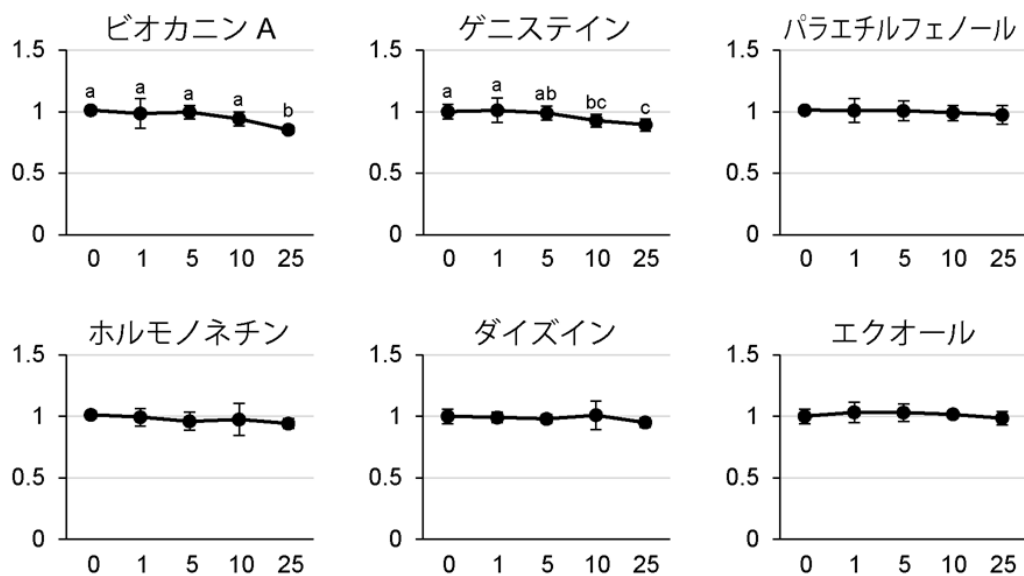


図39 植物エストロゲンがウシ乳腺上皮細胞の増殖性および生存性に及ぼす影響

(A) 細胞増殖性を調べるため、低密度で播種した乳腺上皮細胞を植物エストロゲン存在下で5.5日間培養した。(B) 細胞生存性を調べるため、コンフルエント後から植物エストロゲン存在下で2日間培養した。培養終了後、細胞数をWST8を用いて測定した。グラフの縦軸はコントロールを基準とした相対値を示す。なお、エラーバーは標準偏差を示し、 $n = 8-12$ 、異符号間で有意差あり ($p < 0.05$)。

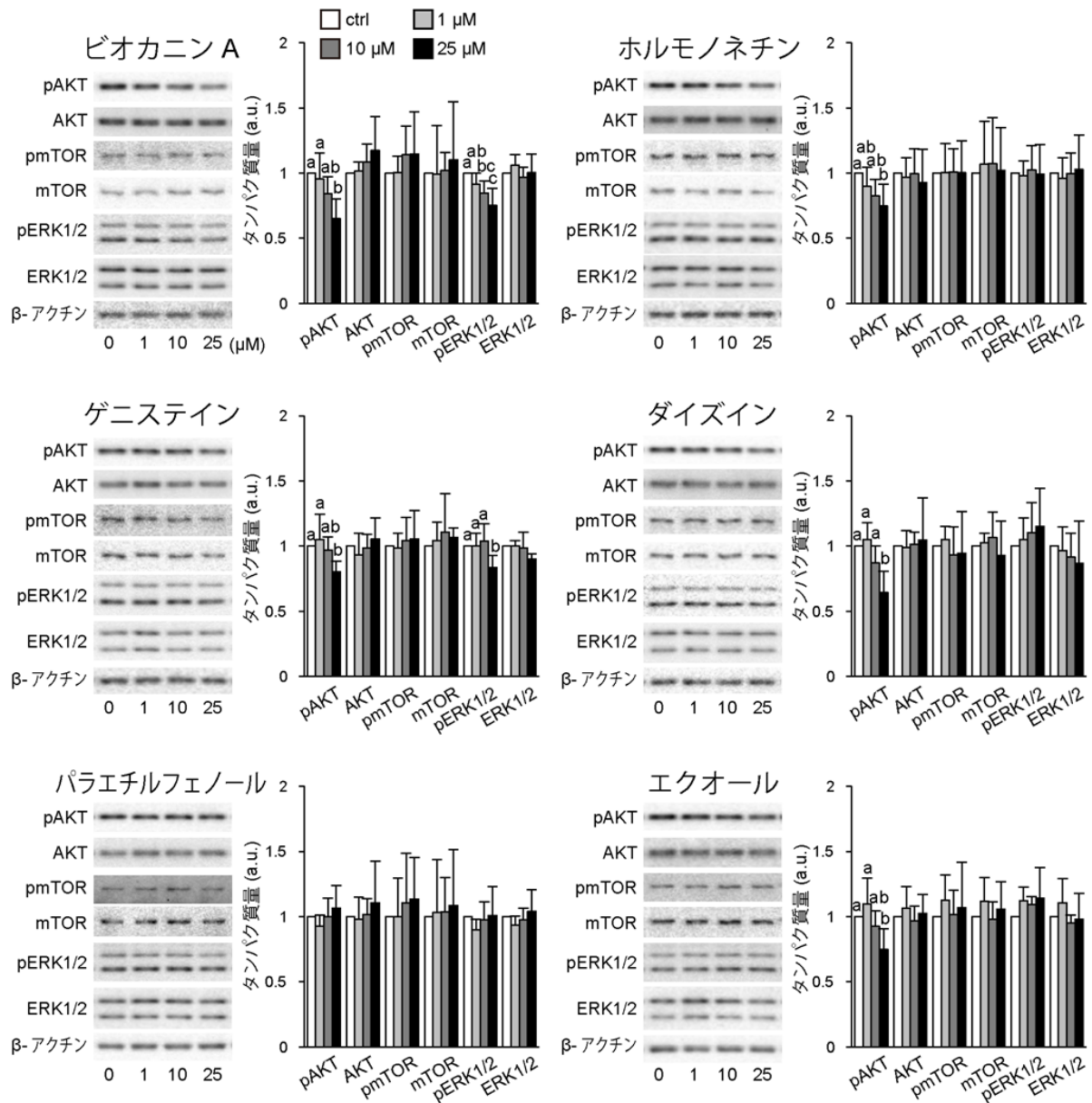


図40 植物エストロゲンがウシ乳腺上皮細胞の増殖性と生存性のシグナル経路に及ぼす影響

サブコンフルエント後のウシ乳腺上皮細胞を植物エストロゲン存在下で1日間培養した。各タンパク質の代表的なウェスタンブロットング像を示す。グラフは検出したバンドをデンストメトリー解析し、β-アクトンで標準化したタンパク質量を示す。グラフの縦軸はコントロールを基準とした相対値を示す。なお、エラーバーは標準偏差を示し、n = 8-12、異符号間で有意差あり (p < 0.05)。

いてコントロール群の 6.5 割程度に減少し、ホルモノネチン処理群およびエクオール処理群では 25 μ M 処理において 7.5 割程度に減少し、ゲニステイン処理群では 25 μ M 処理において 8 割程度に減少していた。また、ビオカニン A 処理群およびゲニステイン処理群の 25 μ M 処理においては pERK1/2 量もコントロール群の 8 割程度に減少していた。パラエチルフェノールは pAKT 量にも pERK1/2 量にも影響していなかった。また、AKT 量、ERK1/2 量、pmTOR 量および mTOR 量はいずれの植物エストロゲンによっても顕著な変化は確認されなかった。

2.3 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

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を種類別に調べるため、乳分泌モデルに各植物エストロゲン処理を 2 日間施し、細胞内およびインサート内層の培地中に分泌された β -カゼイン量とラクトフェリン量をウェスタンブロッティングにより調べた (図 41A)。ビオカニン A 処理群では、25 μ M 処理において培地中 β -カゼイン量がコントロール群の 4 割以下に減少し、細胞内および培地中のラクトフェリン量も 7 割程度に減少していた。ゲニステイン処理群では、10 μ M 処理において細胞内 β -カゼイン量が約 1.4 倍に有意に増加し、培地中 β -カゼイン量も約 1.4 倍に増加していたが、有意差は確認されなかった。一方、ゲニステイン 25 μ M 処理群では細胞内 β -カゼイン量が 9 割程度に減少していた。また、培地中 β -カゼイン量、細胞内および培地中ラクトフェリン量もそれぞれ 7 割、9 割、8 割程度に減少していたが、有意差は確認されなかった。パラエチルフェノール処理群では細胞内ラクトフェリン量が約 1.2 倍に増加していた。細胞内 β -カゼイン量や培地中ラクトフェリン量も増加していたが、有意差は確認されなかった。ダイズイン処理群やエクオール処理群においては、培地中 β -カゼイン量が 1.3 倍以上に増加していたが、有意差は確認されなかった。ホルモノネチン処理群では β -カゼインとラクトフェリンの産生に対する変化はほとんど見られなかった。

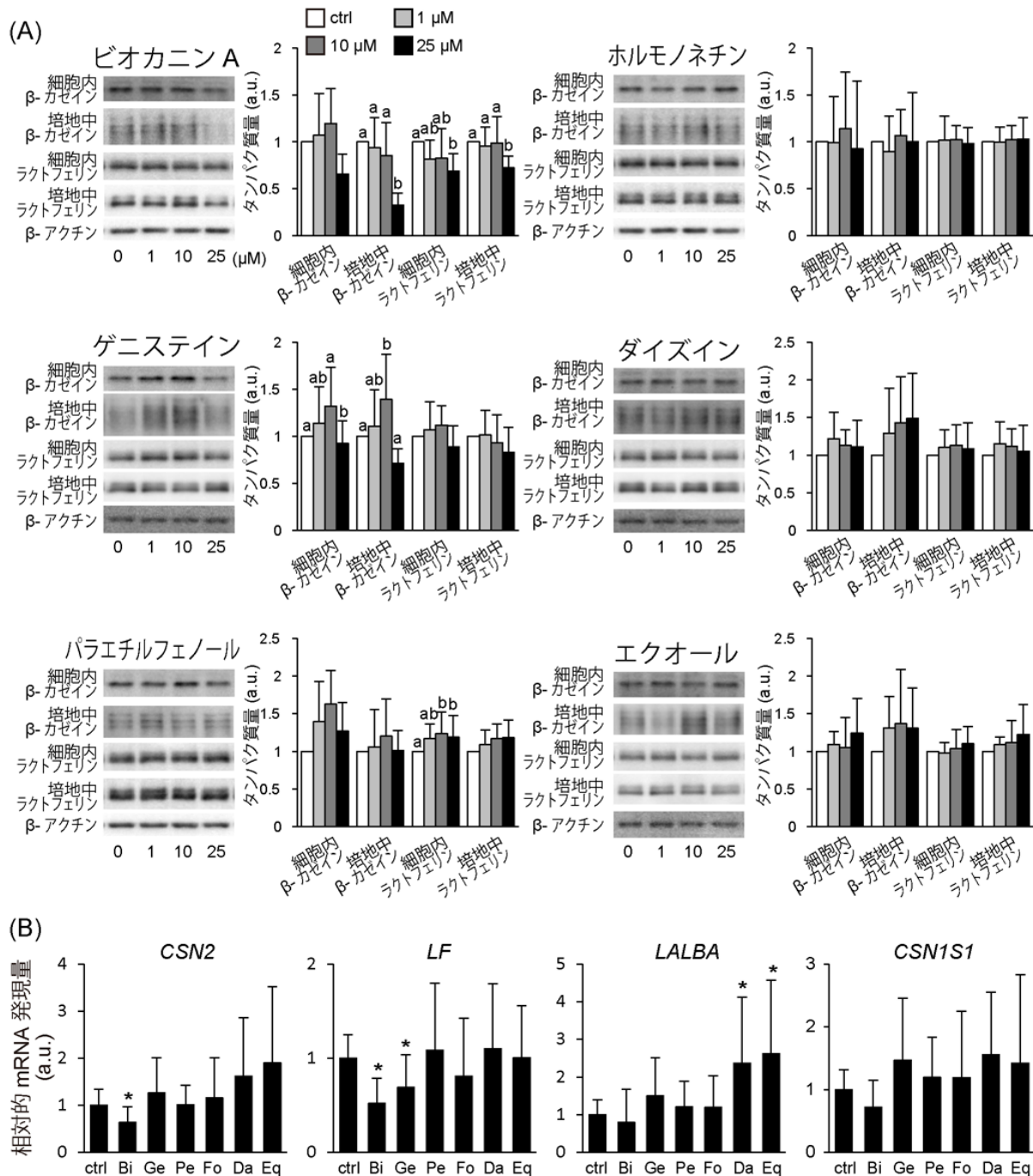


図41 植物エストロゲンがウシ乳腺上皮細胞の乳産生に及ぼす影響

乳分泌モデルのウシ乳腺上皮細胞を各植物エストロゲン (ビオカニンA: Bi, ゲニステイン: Ge, パラエチルフェノール: Pe, ホルモノネチン: Fo, ダイズイン: Da, エクオール: Eq) 存在下で48時間培養した。(A) 各タンパク質の代表的なウェスタンブロットング像を示す。グラフは検出したバンドをデンシトメトリー解析し、 β -アクトチンで標準化したタンパク質量を示す。(B) グラフは各乳タンパク質のmRNA発現量を示す。グラフの縦軸はコントロールを基準とした相対値を示す。なお、エラーバーは標準偏差を示し、 $n = 8-12$ 、*および異符号間で有意差あり ($p < 0.05$)。

続いて、各植物エストロゲン 25 μ M 処理における乳タンパク質 (β -カゼイン：*CSN2*、ラクトフェリン：*LF*、 α -ラクトアルブミン：*LALBA*、 α -カゼイン：*CSN1S1*)の mRNA 発現量を定量 PCR により調べた (図 41B)。ビオカニン A 処理群では *CSN2* および *LF* の mRNA 発現量がそれぞれコントロール群の 5 割、6 割程度に低下していた。ゲニステイン処理群では *LF* の発現量が 7 割程度に減少していたが、*CSN2* はコントロール群と同レベルであった。一方、*LALBA* はダイズイン処理群およびエクオール処理群で 2.3 倍以上に増加していた。また、ホルモノネチン処理群とパラエチルフェノール処理群ではこれらの乳タンパク質の mRNA 発現量に対する顕著な影響は確認されなかった。*CSN1S1* はいずれの植物エストロゲンにおいても、コントロール群に対して有意差は認められなかった。

2.4 植物エストロゲンが STAT5 および STAT3 に及ぼす影響

各植物エストロゲンが乳産生を促進する STAT5 経路と抑制する STAT3 経路に及ぼす影響をウェスタンブロッティングにより調べた (図 42)。ビオカニン A 処理群では、25 μ M 処理において pSTAT5 量がコントロール群の 7 割程度に減少していた。また、pSTAT3 量は 10 μ M 処理では 1.3 倍、25 μ M 処理では 1.4 倍に増加していた。ゲニステイン処理群では、10 μ M 処理により pSTAT5 量が約 1.3 倍に増加し、25 μ M 処理により pSTAT3 量が約 1.3 倍に増加していた。また、ホルモノネチン 25 μ M 処理群では pSTAT3 量が 1.3 倍以上に増加していたが、pSTAT5 量はコントロールと同レベルであった。ダイズイン処理群およびエクオール処理群では濃度依存的に pSTAT5 量が増加し、25 μ M 処理ではコントロール群の 1.5 倍以上であった。パラエチルフェノール処理群では pSTAT5 量や pSTAT3 量に対する顕著な影響は確認されなかった。また、いずれの植物エストロゲンも STAT5 量と STAT3 量には影響していなかった。

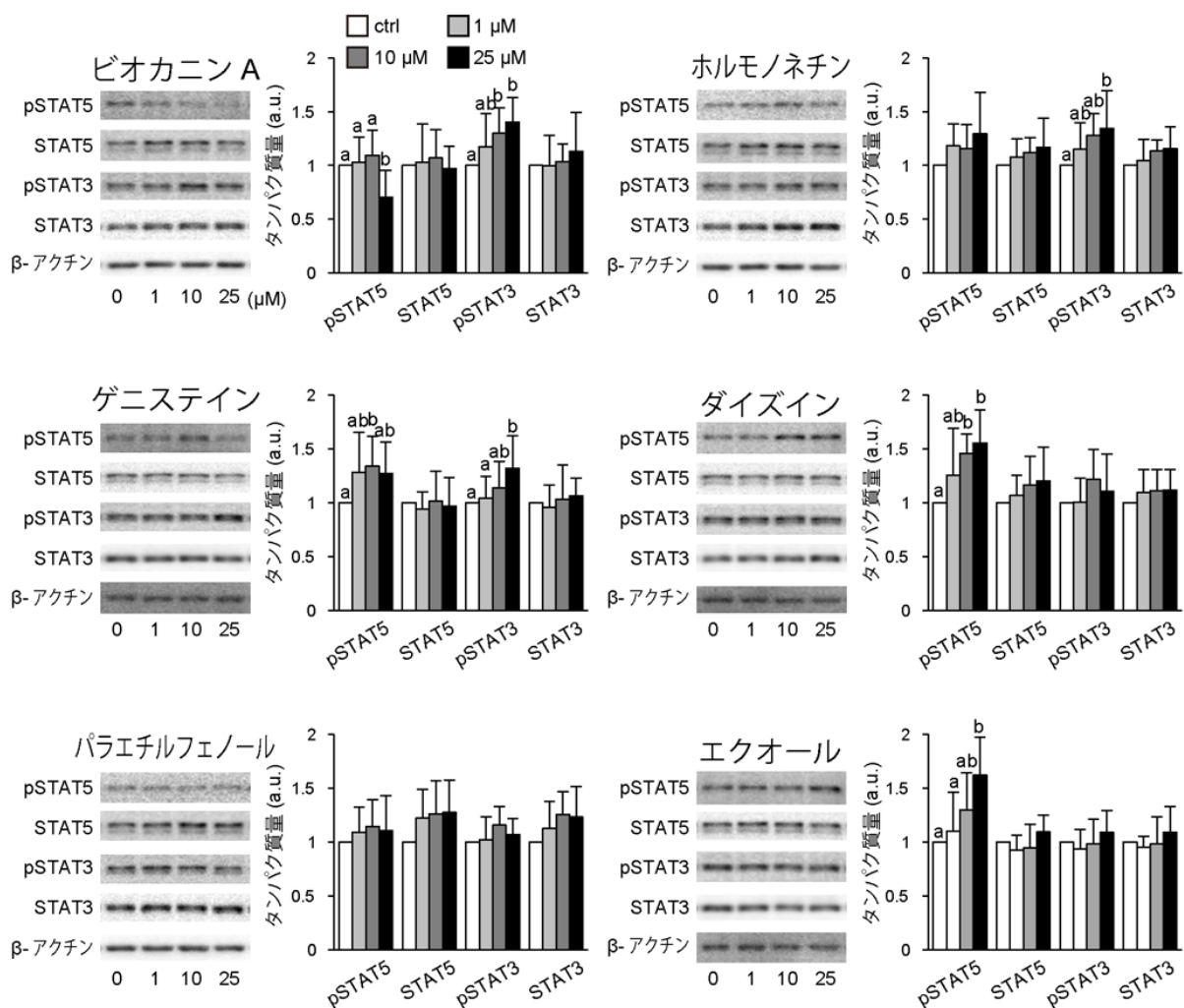


図42 植物エストロゲンがウシ乳腺上皮細胞の乳産生調節シグナル経路に及ぼす影響

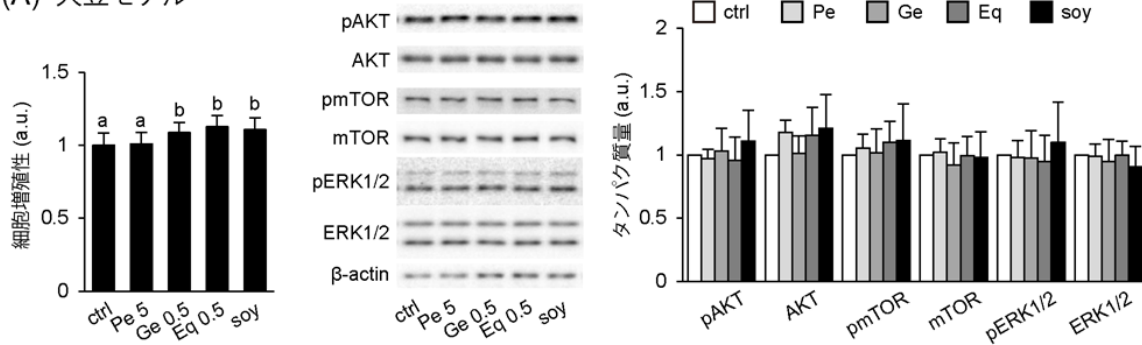
乳分泌モデルのウシ乳腺上皮細胞を各植物エストロゲン(ビオカニンA: Bi, ゲニステイン: Ge, パラエチルフェノール: Pe, ホルモノネチン: Fo, ダイズイン: Da, エクオール: Eq)存在下で48時間培養した。各タンパク質の代表的なウェスタンブロットティング像を示す。グラフは検出したバンドをデンストメトリー解析し、β-アクチンで標準化したタンパク質量を示す。グラフの縦軸はコントロールを基準とした相対値を示す。なお、エラーバーは標準偏差を示し、n = 8-12、異符号間で有意差あり (p < 0.05)。

2.5 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その調節シグナル経路に及ぼす影響

マメ科植物を摂取したウシの血中には複数の植物エストロゲンが存在する。そのため、生体のウシ乳腺上皮細胞は同時に複数の植物エストロゲンに暴露されていることになる。そこで、マメ科植物摂取後のウシ血中の植物エストロゲン組成 (Woclawek-Potocka et al. 2008; Mustonen et al. 2009) に基づいて調製した植物エストロゲン混合物がウシ乳腺上皮細胞の増殖性や増殖を調節するシグナル分子 (AKT、ERK1/2) の活性化に及ぼす影響を調べた。なお、植物エストロゲン混合物として、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) の培地を調製し、その培地で乳腺上皮細胞を培養した。

大豆モデルでは細胞増殖性がコントロール群と比べて約 1.1 倍であり、ゲニステイン 0.5 μ M 処理群およびエクオール 0.5 μ M 処理群と同様に細胞増殖性が増加していた (図 43A)。しかし、大豆モデルの植物エストロゲン混合物は pAKT、AKT、pERK1/2、ERK1/2 の量にほとんど影響していなかった。一方、赤クローバーモデルでは細胞増殖性がエクオール 20 μ M 処理群と同様に 8 割程度に低下していた (図 43B)。また、赤クローバーモデルでは、pAKT 量がコントロール群の 8 割程度に減少していたが、有意差は確認されなかった。pmTOR 量と mTOR 量はダイズイン 2 μ M 処理群とホルモノネチン 0.2 μ M 処理群の間に有意差が確認された。しかし、赤クローバーモデルではコントロール群との間に有意差は確認されなかった。

(A) 大豆モデル



(B) 赤クローバーモデル

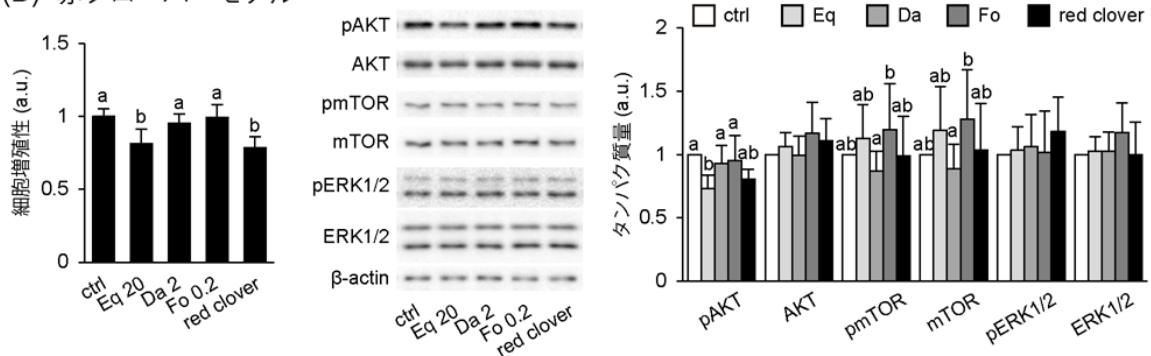


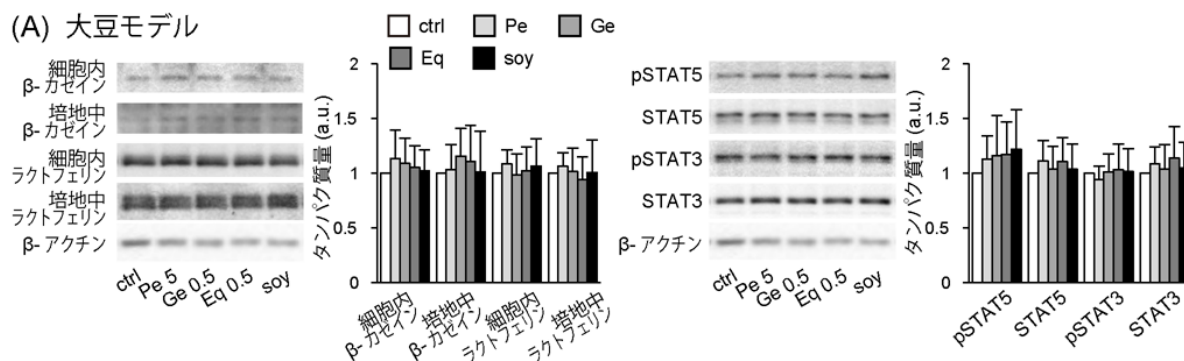
図43 複数の植物エストロゲン存在下におけるウシ乳腺上皮細胞の増殖性

ウシ乳腺上皮細胞を複数の植物エストロゲン存在下で培養した。大豆モデル(soy)としてパラエチルフェノール (Pe) : ゲニステイン (Ge) : エクオール (Eq) = 5 μ M : 0.5 μ M : 0.5 μ M、赤クローバーモデル (red clover)としてEq : ダイズイン (Da) : ホルモノネチン (Fo) = 20 μ M : 2 μ M : 0.2 μ Mの混合溶液を調製した。細胞増殖性は低密度で播種した乳腺上皮細胞を5.5日間、シグナル経路はサブコンフルエントから1日間、植物エストロゲン処理を行った。培養終了後、細胞数をWST8を用いて測定した。また、各タンパク質の代表的なウェスタンブロッティング像および検出したバンドをデンストメトリー解析し、 β -アクチンで標準化したタンパク質量のグラフを示す。グラフの縦軸はコントロールを基準とした相対値を示す。なお、エラーバーは標準偏差を示し、n = 8-12、異符号間で有意差あり (p < 0.05)。

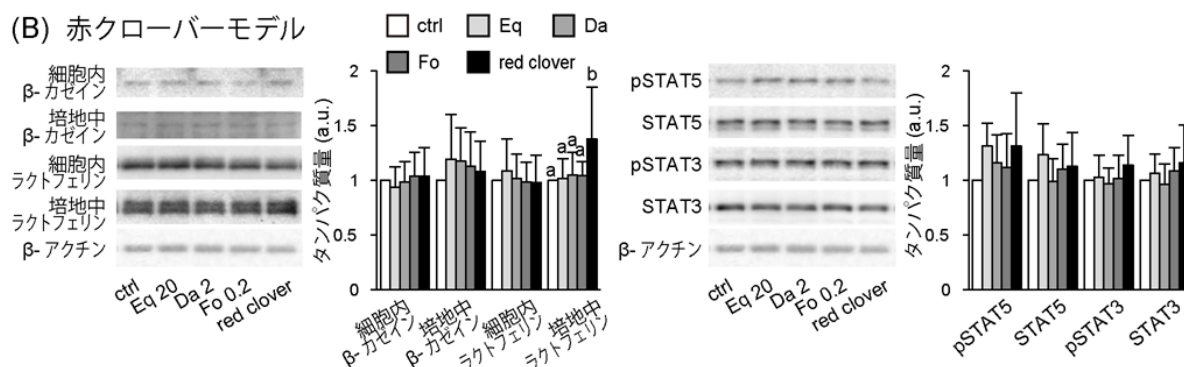
2.6 植物エストロゲン混合物がウシ乳腺上皮細胞の乳産生とその調節シグナル経路に及ぼす影響

大豆モデルの植物エストロゲン混合物で 2 日間処理した乳腺上皮細胞では、細胞内および培地中の β -カゼイン量とラクトフェリン量に顕著な影響は確認されなかった (図 44A)。pSTAT5 量はコントロール群の約 1.2 倍に増加していたが、統計的な有意差は確認されなかった。一方、赤クローバーモデルでは培地中ラクトフェリン量が約 1.4 倍に増加し、統計的な有意差も確認された (図 44B)。また、pSTAT5 量も約 1.4 倍に増加していたが、統計的な有意差は確認されなかった。続いて、乳タンパク質合成への影響を定量 PCR により mRNA レベルで調べたところ、赤クローバーモデルでは *LALBA* がコントロール群の 2 倍以上に増加していた (図 44C)。しかし、大豆モデルでは乳タンパク質の mRNA 発現量への顕著な影響は確認されなかった。

(A) 大豆モデル



(B) 赤クローバーモデル



(C)

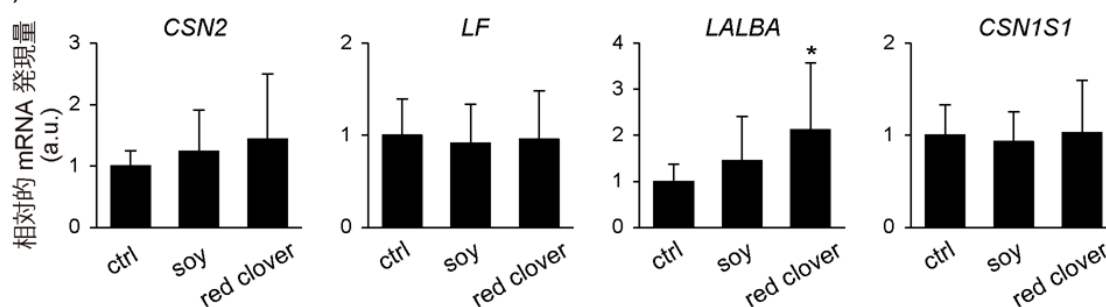


図44 複数の植物エストロゲン存在下におけるウシ乳腺上皮細胞の乳産生

乳分泌モデルのウシ乳腺上皮細胞を複数の植物エストロゲン存在下で培養した。大豆モデル (soy)としてパラエチルフェノール (Pe)：ゲニステイン (Ge)：エクオール (Eq) = 5 μ M：0.5 μ M：0.5 μ M、赤クローバーモデル (red clover)としてEq：ダイズイン (Da)：ホルモノネチン (Fo) = 20 μ M：2 μ M：0.2 μ Mの混合溶液を調製し、2日間処理を行った。(A) 各タンパク質の代表的なウェスタンブロットティング像および検出したバンドをデンストメトリー解析し、 β -アクチンで標準化したタンパク質量のグラフを示す。(B) グラフは各乳タンパク質のmRNA発現量を示す。グラフの縦軸はコントロールを基準とした相対値を示す。なお、エラーバーは標準偏差を示し、n = 8-12、*および異符号間で有意差あり ($p < 0.05$)。

3 考察

大豆や赤クローバーなどのマメ科植物は乳牛の飼料として多用されている。マメ科植物は根粒菌とともに窒素固定を行うことで土壌を改良するほか (Masson-Boivin et al. 2009; Signorelli et al. 2020)、豊富にタンパク質が含まれており栄養の面から乳生産の向上に寄与する (Moorby et al. 2016; Nursoy et al. 2018)。大豆や赤クローバーには生理活性物質である植物エストロゲンが豊富に含まれているが、含有する植物エストロゲンの種類や量は植物の種類や部位 (葉、茎、根) によって異なる (Lookhart 1980; Mazur 1998; Andersen et al. 2009)。しかし、泌乳期の乳産生における植物エストロゲンの影響を種類別に検証した例はない。その理由の 1 つとして、これらの植物エストロゲンは生体内で別の植物エストロゲンに代謝され、さらにその代謝能力には個体差があることが挙げられる (Watanabe et al. 1998; Zhao et al. 2006)。そのため、生体レベルで各植物エストロゲンの影響を種類別に調べることは難しい。そこで、本章では前章で作製した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増殖性や乳産生およびその調節シグナル経路に及ぼす影響について検証した。その結果、植物エストロゲンはマウス乳腺上皮細胞とはやや異なる様式で種類別にウシ乳腺上皮細胞に作用することが明らかになった (表 2、表 1 ; 52 ページ)。

泌乳期の乳腺上皮細胞ではプロラクチン/STAT5 経路が活性化し、様々な乳成分を産生するようになる (Watson and Burdon 1996)。一方、離乳後や乳房炎時の乳腺上皮細胞では STAT3 経路の活性化とともに乳産生が低下する (Singh et al. 2016)。乳分泌モデルを用いて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

表2 植物エストロゲンがウシ由来乳腺上皮細胞に及ぼす影響

	ビオカニン A	→	ゲニステイン 高濃度	→	ゲニステイン 低濃度	→	パラエチルフェノール
細胞増殖性	↘		↘		↘		—
細胞生存性	↘		↘		—		—
AKT 経路	↘		↘		—		—
ERK1/2 経路	↘		↘		—		—
乳成分産生	↘		↘		↗		↗
STAT5 経路	↘		—		↗		—
STAT3 経路	↗		↗		—		—

	ホルモノネチン	→	ダイズイン	→	エクオール
細胞増殖性	↘		↘		↘
細胞生存性	—		—		—
AKT 経路	↘		↘		↘
ERK1/2 経路	—		—		—
乳成分産生	—		↗		↗
STAT5 経路	—		↗		↗
STAT3 経路	↗		—		—

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 (Sorensen et al. 2006)。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 (Worster et al. 2012)。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活性化させる作用がある (Pfitcher et al. 2008)。ER 経路の活性化は AKT 経路を調節する (Bjornstrom and Sjoberg 2005; Cotrim et al. 2013)。ゲニステインやエクオールは ER 経路を介して細胞増殖を抑制することも知られている (Obiorah et al. 2014; Weis and Raetzman 2019)。また、ダイズインやエクオールは乳ガン細胞において AKT 経路を不活性化し、細胞増殖性を抑制する (Kaushik et al. 2018; Zhang et al. 2019)。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 (Pfitcher et al. 2008)。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 (Manna 2012)。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 (Woclawek-Potocka et al. 2008; Mustonen et al. 2009)。また、大豆飼料や赤クローバーサイレージの給与によって、乳牛の乳生産性に顕著な影響が確認されない場合も報告されている (Broderick et al. 2015; Broderick 2018)。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、一方で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、これらを含有する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 (Woclawek-Potocka et al. 2008; Kowalczyk-Zieba et al. 2011)。例えば、植物エストロゲンの代謝活性が低い場合、ビオカニン A やゲニステインなど阻害的に作用する植物エストロゲンの血中濃度が上昇し、代謝活性が高い場合ではエクオールなどの促進的に作用する植物エストロゲンの血中濃度が上昇する。したがって、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。

本章では、乳牛へ給与されるマメ科植物に含まれる植物エストロゲンが乳腺上皮細胞の増殖性、生存性、乳産生、およびそれらに関連する細胞内シグナル経路に及ぼす影響を調べた。その結果、パラエチルフェノールを除く植物エストロゲンは AKT 経路の不活性化とともに乳腺上皮細胞の増殖性を低下させることが明らかになった。また、各植物エストロゲンは 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能力に対しても影響を及ぼしていた。興味深いことに、植物エストロゲン代謝経路の上流から下流に向かって、各植物エストロゲンの乳産生への影響は阻害的作用から促進的作用に変化していた。さらに、複数の植物エストロゲンが存在すると、その影響は個々の植物エストロゲンの影響をそのまま反映する場合と相殺される場合があることも明らかになった。以上の新規知見より、乳牛へのマメ科植物給与の際には、含まれる植物エストロゲンの種類や量、乳牛における植物エストロゲンの代謝能力などに配慮する必要があることを提案する。

第五章 総括

本研究では、乳腺上皮細胞の乳生産性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を試みた。そのために第二章では、マウス乳腺上皮細胞の乳分泌モデルを用いた培養実験と泌乳期マウスへの腹腔内投与による生体実験を行い、各植物エストロゲンが乳生産に及ぼす影響を調べた。第三章では、植物エストロゲンがウシ乳腺上皮細胞の乳生産に及ぼす影響を調べるための *in vitro* 乳分泌モデルを作製し、その生体反映性について乳房炎起炎菌毒素を用いた実験により検証した。第四章では、作製した乳分泌モデルを用いて各植物エストロゲンがウシ乳腺上皮細胞の乳生産に及ぼす影響を調べた。

第二章の結果から、まず、*in vitro* におけるマウス乳腺上皮細胞の乳生産に対して植物エストロゲンは種類依存的に影響を及ぼすことが明らかになった。植物エストロゲンは、TJ による Blood-milk barrier に対しても種類依存的に作用し、クメストロールやゲニステインは乳腺上皮細胞のアポトーシスをも誘導していた。また、植物エストロゲンを泌乳期マウスに腹腔内投与した実験により、植物エストロゲンが生体の乳生産に対しても種類依存的に影響することが判明した。さらに、ゲニステインによる乳生産抑制作用の作用機序を調べたところ、ゲニステインは STAT5 の新規のリン酸化を阻害することで乳生産を抑制することが明らかになった。以上より、植物エストロゲンはマウス乳腺上皮細胞の乳生産や Blood-milk barrier に対して *in vitro* と *in vivo* の両方で種類依存的に特定の作用機序を介して影響を及ぼすことが明らかになった。

第三章では、まず、ウシ乳腺上皮細胞を用いた *in vitro* 乳分泌モデルの作製を試みた。その結果、細胞の足場としてコラーゲンゲルで被覆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 BPE と Dex が有効であることが判明した。泌乳期の乳腺上皮細胞は乳成分を合成するため、側底部細胞膜に局在する輸送体を介してグルコースやアミノ酸などの基質を細胞内に取り込む。各乳成分を合成した後、乳タンパク質や乳糖は開口分泌により、乳脂質は離出分泌により頂端部細胞膜から乳腺胞内腔に分泌される。また、こ

のような細胞極性を獲得するためには、TJ の形成が必要不可欠である。なぜなら、TJ は頂端部側から分泌された乳成分が体内に漏出することを防ぎ、側底部側細胞膜と頂端部細胞膜を区画することによって膜タンパク質の特異的な局在を維持しているからである。しかし、従来の培養モデルでは乳産生能力のみが重視され、TJ を有する培養モデルは存在していなかった。一方で今回作製した乳分泌モデルでは、乳腺上皮細胞は乳産生能力を備え、強固な TJ を形成し、なおかつ膜タンパク質の局在や乳分泌にも明確な細胞極性が確認された。また、作製した乳分泌モデルは乳房炎起炎菌毒素である LPS および LTA の刺激を受けて、生体と同様に炎症反応を起こすとともに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。さらに、LPS や LTA が膜タンパク質の細胞内局在を特異的に変化させることが新たに見出された。以上より、作製した乳分泌モデルは乳房炎起炎菌毒素に対して生体同様の反応を示し、ウシ乳腺上皮細胞の乳産生に対する生理活性物質の影響を調べるモデルとして適していることが明らかになった。

第四章では、作製した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を調べた。その結果、植物エストロゲン代謝経路の上流であるビオカニン A やホルモノネチン、高濃度のゲニステインでは乳産生に阻害的な影響を示すことが明らかになった。一方、代謝経路の下流であるエクオール、ダイズインおよび低濃度のゲニステインでは乳産生に促進的な作用が確認された。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下流の植物エストロゲンへ代謝・変換される。すなわち、泌乳期の乳産生と植物エストロゲンの代謝作用には因果関係があることが見出された。また、乳牛の泌乳期間は 280 日程度と長いため、乳腺上皮細胞は泌乳期においても増殖活性を示す。そこで、植物エストロゲンが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において増殖活性ならびに増殖性に関わる AKT 経路の活性化レベルが低下していた。乳牛の乳腺における乳産生は個々の乳腺上皮細胞の乳産生能力と細胞数の乗数により決定される。そのため、植物エストロゲンの過剰摂取は細胞数の低下

を招き、結果として乳産生を低下させるかもしれない。さらに、複数の植物エストロゲン存在下での影響を調べた。その結果、乳牛が大豆飼料や赤クローバー飼料などを摂取した場合に血中に存在する植物エストロゲンは、ウシ乳腺上皮細胞の乳産生能力にほとんど影響しないことが判明した。また、単独の植物エストロゲンの影響が複数存在下でも反映される場合や複数の植物エストロゲンの作用が相殺される場合があることも明らかになった。

以上より、植物エストロゲンは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影響を及ぼすことが明らかになった。本研究で得られた研究成果に基づき、泌乳牛へのマメ科植物の給与は、含まれる植物エストロゲンの種類や量および個々の植物エストロゲン代謝能力を考慮する必要があることを提案する。また、本研究で作製した *in vitro* 乳分泌モデルは生体反映性の高いモデルであり、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も証明された。今後、ウシの乳生産性を調節する生理活性物質のスクリーニング実験や個体レベルでは調べるのが困難である乳産生メカニズムの解明にこの培養モデルを活用することによって、乳牛の乳生産性向上に寄与することが期待される。

第六章 材料と方法

1 実験動物

本実験では、マウス由来乳腺上皮細胞を単離するために 9–14 週齢の未経産 ICR 雌マウス、および植物エストロゲンの投与実験のために泌乳期 ICR マウスを供試した（三協ラボサービス）。実験期間中は、自由採食（ラボ MR ストック、日本農産工業）、自由飲水で飼育した。飼育室の温度は 24°C 前後、12 時間ごとの明暗条件で管理した。また、ウシ由来乳腺上皮細胞を単離するため、6–7 年齢の乾乳期ホルスタイン牛（北海道大学北方生物圏フィールド科学センター生物生産研究農場）、および乳腺組織の免疫染色のために泌乳期ホルスタイン牛（国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所北海道支所）を供試した。ホルスタイン牛は静脈内へのフェノバルビタールナトリウムの過剰投与（20 mg/kg）した後、頸動脈から放血することで安楽死させた。本研究における動物実験は、国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定あるいは国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構の動物実験等実施規定に基づいて行った。

2 試薬類

本実験に用いたエストラジオール（E2）、ホルモノネチン（Fo）、パラエチルフェノール（Pe）およびエクオール（Eq）は Sigma-Aldrich から購入した。ビオカニン A（Bi）およびダイズイン（Da）は LKT Laboratories、クメストロール（Co）およびゲニステイン（Ge）は Santa Cruz から購入した。また、LPS（*E. coli* O55:B5 由来）および LTA（*S. aureus* 由来）は Sigma-Aldrich から購入し、IL18、TNF α 、IL6、IL8、CCL5 は Kingfisher Biotech から購入した。JSH-23 は Toronto Research Chemicals、SB23058 は和光純薬工業、AG1478 は Enzo Life Sciences から購入した。また、特定の実験に使用した試薬類の購入先は各実験方法の小節に記述している。

免疫染色およびウェスタンブロッティングに用いた一次抗体の購入先と希釈率は表 3 に示す通りである。なお、ウシ乳腺上皮細胞に用いる β -カゼインの抗体は、Sigma-Aldrich から購入した β -カゼインを BALB/c マウスに投与することによって作製した。

免疫染色の二次抗体は、Thermo Fisher から購入した Alexa 488 標識抗ウサギ IgG 抗体 (ヤギ由来)、Alexa 488 標識抗マウス IgG 抗体 (ヤギ由来)、Alexa 647 標識抗ウサギ IgG 抗体 (ヤギ由来)、Alexa 546 標識抗マウス IgG 抗体 (ヤギ由来)、Alexa 555 標識抗ウサギ IgG 抗体 (ヤギ由来)、Alexa 488 標識抗ヤギ IgG 抗体 (ロバ由来)、Alexa 549 標識抗ウサギ IgG 抗体 (ロバ由来)をそれぞれ 200 倍希釈で使用した。ウェスタンブロッティングの二次抗体は、Sigma-Aldrich から購入した Horseradish peroxidase 標識の抗ウサギ、抗ヤギあるいは抗マウス IgG 抗体 ($\times 2500$ – 5000)を使用した。

3 マウス由来乳腺上皮細胞の培養に用いる増殖培地および分化培地の調製

基礎培地として、1%ペニシリン・ストレプトマイシン・グルタミン混合液 (Thermo Fisher)を含む RPMI-1640 培地 (Sigma-Aldrich)を使用した。

増殖培地として、5%ウシ胎児血清 (FBS、Boehringer Mannheim)、5 $\mu\text{g/mL}$ インシュリン (和光純薬工業)、10 ng/mL 上皮成長因子 (EGF、BD Biosciences)を含む基礎培地を使用した。なお、FBS は 57°C で 30 分間の非働化処理を施したものを使用した。

分化培地として、1% FBS、10 $\mu\text{g/mL}$ インシュリン、10 ng/mL EGF、0.5 U/mL プロラクチン (Sigma-Aldrich)、1 μM デキサメタゾン (Dex、Sigma-Aldrich)を含む基礎培地を使用した。なお、上記のプロラクチンは 2017 年に製造中止になったため、以降の実験では 100 ng/mL プロラクチン (Protein Laboratories Rehovot)もしくは 0.1%ウシ脳下垂体抽出物 (BPE、KURABO)を使用した。また、内因性因子の E2 および外因性因子の植物エストロゲンを含む分化培地も調製した。なお、E2 および植物エストロゲンを加える培養実験では、分化培地の Dex 濃度を 1 nM とした。

表3 本実験で用いた一次抗体とその希釈率

	由来	WB	IF	メーカー
クローデイン-1	ウサギ	×500	×100	Abcam
クローデイン-3	ウサギ	×1000	×400	Thermo Fisher Scientific
クローデイン-4	ウサギ	×1000	×400	Thermo Fisher Scientific
クローデイン-7	ウサギ	×1000	×400	Thermo Fisher Scientific
オクルディン	ウサギ	×1000		Thermo Fisher Scientific
オクルディン	マウス		×400	Thermo Fisher Scientific
カスパーゼ-3	ウサギ	×1000		Cell Signaling Technology
活性型カスパーゼ-3	ウサギ	×1000	×200	Cell Signaling Technology
Bax	ウサギ	×1000		BioLegend
Bcl2	マウス	×1000		BioLegend
STAT5	ウサギ	×1000		Cell Signaling Technology
pSTAT5	ウサギ	×1000		Cell Signaling Technology
pSTAT5a	ウサギ		×300	Abcam
GR	ウサギ	×1000		Sigma-Aldrich
pGR	ウサギ	×1000		Cell Signaling Technology
STAT3	ウサギ	×2000		Santa Cruz Biotechnology
pSTAT3	ウサギ	×1000		Cell Signaling Technology
pJAK2	ウサギ	×750		Cell Signaling Technology
JAK2	ウサギ	×750		Cell Signaling Technology
ERα	ウサギ	×500		Sigma-Aldrich
pERα	ウサギ	×750		Sigma-Aldrich
ERβ	ウサギ	×1000		Abcam
pEGFR	ウサギ	×1000		Cell Signaling Technology
EGFR	ウサギ	×1000		Cell Signaling Technology
EGFR	ウサギ		×400	Abcam
pMEK1/2	ウサギ	×1000		Cell Signaling Technology
MEK1/2	ウサギ	×1000		Cell Signaling Technology
ERK1/2	ウサギ	×1000		Cell Signaling Technology
pERK1/2	ウサギ	×1000		Cell Signaling Technology
p38	ウサギ	×1000		Cell Signaling Technology
pp38	ウサギ	×1000		Cell Signaling Technology
JNK	ウサギ	×1000		Cell Signaling Technology
pJNK	ウサギ	×1000		Cell Signaling Technology
NFκB	ウサギ	×1000		Abcam
pNFκB	ウサギ	×1000		Cell Signaling Technology
AKT	ウサギ	×1200		Cell Signaling Technology
pAKT	ウサギ	×1200		Cell Signaling Technology
mTOR	ウサギ	×1200		Cell Signaling Technology
pmTOR	ウサギ	×1200		Cell Signaling Technology
AQP3	ウサギ	×750	×300	Almone Labs
AQP5	ウサギ	×750	×300	Almone Labs
GLUT1	ウサギ	×750	×300	Dako
GM130	ウサギ		×400	Abcam
TLR2	ウサギ	×750	×200	Santa Cruz Biotechnology
TLR4	ウサギ	×750	×200	Santa Cruz Biotechnology
α-カゼイン	ウサギ	×1000		Santa Cruz Biotechnology
β-カゼイン	ヤギ	×750	×300	Santa Cruz Biotechnology
β-カゼイン	マウス	×1000	×400	自作
ラクトフェリン	ウサギ	×2000		Life Science Laboratories
β-アクチン	マウス	×20000		Sigma-Aldrich
lamin A/C	マウス	×1000		Santa Cruz Biotechnology
α-tubulin	マウス	×1000		Sigma-Aldrich

4 ウシ由来乳腺上皮細胞の培養に用いる増殖培地および分化培地の調製

基礎培地として、1%ペニシリン・ストレプトマイシン・グルタミン混合液および 5 mM 酢酸ナトリウムを含む DMEM/F12 培地 (Sigma-Aldrich)を使用した。

細胞増殖性や生存性を調べる際の増殖培地として、1% FBS、5 $\mu\text{g/mL}$ ITS-X (和光純薬工業)、10 ng/mL EGF、14.1 $\mu\text{g/mL}$ ホスホリルエタノールアミン (Sigma-Aldrich)を含む基礎培地を使用した。

コラーゲンを被膜したセルカルチャーインサート上培養の増殖培地として、5 mg/mL ウシ血清アルブミン (BSA、Sigma-Aldrich)、5 $\mu\text{g/mL}$ ITS-X、10 ng/mL EGF、14.1 $\mu\text{g/mL}$ ホスホリルエタノールアミンを含む基礎培地を使用し、乳分泌誘導培地として、5 mg/mL BSA、5 $\mu\text{g/mL}$ ITS-X、10 ng/mL EGF、14.1 $\mu\text{g/mL}$ ホスホリルエタノールアミン、0.1% BPE、100 nM Dex、100 μM オレイン酸 (Sigma-Aldrich)を含む基礎培地を使用した。なお、オレイン酸は 50 mg/mL BSA 溶液に懸濁した後に超音波処理を施し、可溶化したものを培地調製に用いた。

5 カバーガラスのコーティング処理

免疫染色用の乳腺上皮細胞は、接着性を向上させるためコラーゲンコーティングを施したカバーガラス上に播種した。コーティングの前処理のため、カバーガラス (松浪硝子、直径 15 mm)を 1 M NaOH に浸して 30 分間室温で振盪し、超純水で 3 回洗浄した後、1 M HCl に浸して 30 分間室温で振盪した。超純水で 3 回洗浄した後、70%エタノールに浸して 10 分間室温で振盪し、クリーンベンチ内でエタノールを揮発させてカバーガラスを乾燥させた。続いて、ブタ腱由来 I 型コラーゲン (セルマトリックス Type IA ; 0.1 mg/mL、新田ゼラチン)と Poly-L-Lysine (2.5 $\mu\text{g/mL}$ 、Sigma-Aldrich)を含む 0.1%酢酸溶液に浸し、カバーガラス同士が重ならないように注意して 4°C で一晩浸漬した。浸漬後、コーティングし

たカバーガラスは PBS (8.0 g/L NaCl、0.20 g/L KCl、1.15 g/L Na₂HPO₄、0.20 g/L KH₂PO₄) で 2 回洗浄した後、培養に使用した。

6 コラーゲンゲルの調製

ウシ乳腺上皮細胞の乳分泌モデルではセルカルチャーインサートの被膜材として、コラーゲンゲルを用いた。コラーゲンゲルはセルマトリックス Type IA、5 倍濃縮 DMEM/F12 培地、コラーゲンゲル再構成用緩衝溶液をそれぞれ 7:2:1 の比率で氷上にて混合した後、24 well 用インサートに 75 μ L 滴下し、37°C で 30 分間静置してゲル化させた。なお、コラーゲンゲル再構成用緩衝溶液は 2.2% NaHCO₃ および 200 mM HEPES を含む 0.05 N NaOH 溶液を濾過滅菌したものを使用した。

7 マウスおよびウシ乳腺上皮細胞の単離

未経産マウス 2 匹を頸椎脱臼によって安楽死させた後、速やかに腹部の皮膚を剥離して第 4 乳腺を採取した。取り出した乳腺を PBS の入った 50 mL チューブに移し、クリーンベンチ内で PBS による洗浄を 3 回行った。続いて、ピンセットを用いてリンパ節や結合組織を除去した後、メスで乳腺を 0.5–1.0 mm 角に細切した。また、ウシ乳腺上皮細胞の場合、屠殺後の乾乳期ホルスタイン牛から採取した乳腺実質を基礎培地で洗浄した後、氷冷下で保存しながら研究室に運び、クリーンベンチ内で細切した。細切したマウスあるいはウシの乳腺はコラゲナーゼ溶液 40 mL の入った 50 mL チューブに移し、37°C に設定した恒温振盪機 (TAITEC) 内で反応させた。なお、コラゲナーゼ溶液としてマウスの場合は 0.75 mg/mL コラゲナーゼ (和光純薬工業) を含む基礎培地、ウシの場合は 1.5 mg/mL コラゲナーゼを含む基礎培地を使用した。マウスの場合は 1 時間、ウシの場合は 1.5 時間振盪しながら 37°C でコラゲナーゼと反応させた後、パスツールピペットを用いてピペッティングを行

い、さらに同時間振盪した。反応終了後、再びパスツールピペットでピペッティングを行い、遠心分離機 (KUBOTA2010、久保田製作所)を用いて遠心分離 (645 g、1 分間)し、上清を取り除いた。沈殿画分に基礎培地 5 mL を加え、ピペッティングによってほぐした後、その懸濁液を新しい 15 mL チューブに移し、最終濃度が 0.2%となるように 2%トリプシン (GIBCO)を含む PBS を加えた。室温でトリプシンと反応させながら、沈殿の塊が肉眼的に観察されなくなるまでピペッティングした。遠心分離 (645 g、1 分間)して上清を取り除いた後、基礎培地 2 mL と FBS 4 mL を加え、ピペッティングによって沈殿をほぐし、低速で遠心分離 (3 g、5 分間)した。得られた沈殿に基礎培地 5 mL を加え、ピペッティングにより沈殿をほぐした後に遠心分離 (645 g、1 分間)し、上清を取り除いた。新たに 0.2%トリプシン溶液を含む基礎培地を 6 mL 加え、ピペッティングによって沈殿をほぐし、遠心分離 (645 g、1 分間)した。上清を取り除いた後、基礎培地 2 mL と FBS 4 mL を加え、ピペッティングして沈殿をほぐし、低速で遠心分離 (3 g、5 分間)した。遠心後に上清を取り除いて得られた沈殿を乳腺上皮細胞塊として実験に使用した。なお、単離したウシ乳腺上皮細胞塊は細胞凍結保存液バンバンカー® (GC リンフォテック)に懸濁し、液体窒素中で凍結保存した。

8 マウス乳腺上皮細胞の培養

前述の「7 マウスおよびウシ乳腺上皮細胞の単離」の操作により得られた乳腺上皮細胞塊を増殖培地で懸濁し、播種した。なお、ウェスタンブロッティングおよび定量 PCR 用サンプルの場合は、12 well 細胞培養プレート (Techno Plastic Products)の各 well に 2 個のクローニングシリンダー (直径 5 mm、Cloning Ring、旭硝子)を立てたもの、もしくは 24 well 細胞培養プレート (BD Biosciences)の各 well に 1 個のクローニングシリンダーを立てたものに、乳腺上皮細胞が入った増殖培地を 200 μ L ずつシリンダー内に滴下した。また、シリンダーが動かないように注意しながらシリンダーの外側にも増殖培地を適量入れた。免疫

染色用サンプルの場合は、6 well 細胞培養プレート (Techno Plastic Products)の各 well にコラーゲンコーティングしたカバーガラスを 3 枚配置し、その上にシリンダーを立てた。前述のウェスタンブロッティング用サンプルの場合と同様に乳腺上皮細胞が入った増殖培地を 200 μ L ずつシリンダー内に入れ、各 well のシリンダーの外側にも増殖培地を適量入れた。セルカルチャーインサート培養の場合は、乳腺上皮細胞が入った増殖培地を 200 μ l ずつインサート内層に入れ、外層にも増殖培地を 600 μ L 入れた。セルカルチャーインサートは BD Biosciences から購入したポリエチレンテレフタレート膜の 24 well 用 (ポアサイズ 0.4 μ m)を使用した。

増殖培地で 4 日間培養後、シリンダーを取り除き、さらに 2 日間増殖培地で培養した。続いて、分化培地で乳腺上皮細胞の分化誘導を行った。増殖培地を除いた後、12 well 細胞培養プレートの場合は 750 μ L、24 well 細胞培養プレートの場合は 400 μ L、6 well 細胞培養プレートの場合は 2000 μ L、セルカルチャーインサートの場合は内層に 250 μ L、外層に 800 μ L の分化培地を入れた。分化培地で 3 日間培養後、実験に応じて E2 および植物エストロゲン(0.1–25 μ M)を含む分化培地で 2 日間もしくは 7 日間培養した。なお、分化培地の培地交換は 2 日に 1 度あるいは毎日行った。

9 ウシ乳腺上皮細胞の培養

前述の「7 マウスおよびウシ乳腺上皮細胞の単離」の操作で凍結保存した乳腺上皮細胞を解凍後、増殖培地で懸濁した。細胞増殖性や生存性およびその調節シグナル経路への影響を調べる実験の場合、まず、懸濁した乳腺上皮細胞塊を 60 mm²ディッシュ (BD Biosciences) に播種し、培養した。コンフルエント後、0.2%トリプシンおよび 2 mM エチレンジアミン四酢酸を含む PBS により乳腺上皮細胞をディッシュから剥離し、細胞密度を血球計算盤で測定した。細胞増殖性を調べる場合、継代した乳腺上皮細胞を 1×10^3 cell/well で 96 well 細胞培養プレートに播種した。播種 12 時間後、細胞が接着したことを確認し、植物エスト

ロゲンを含む単層培養用増殖培地に交換し、さらに 5.5 日間培養した。細胞生存性を調べる場合、継代した乳腺上皮細胞を 1×10^4 cell/well で 96 well 細胞培養プレートに播種した。コンフルエント後、植物エストロゲンを含む専用の増殖培地に交換し、2 日間培養を行った。また、細胞増殖に関わるシグナル経路への影響を調べる場合、継代した乳腺上皮細胞を 2×10^4 cell/well で 48 well 細胞培養プレートに播種した。サブコンフルエント後、植物エストロゲンを含む単層培養用増殖培地に交換し、1 日間培養を行った。

乳分泌モデル作製のため、解凍した乳腺上皮細胞塊を専用の増殖培地に懸濁し、24 well 細胞培養プレートの各 well に 1 個ずつ立てたクローニングシリンダー、セルカルチャーインサート、もしくはコラーゲンゲルを被膜したセルカルチャーインサート内に 200 μ L ずつ播種した。また、専用の増殖培地をそれぞれシリンダーの外側に 400 μ L、もしくはインサート外層に 600 μ L 入れた。増殖培地で 3 日間培養後、プレートの各 well からシリンダーを取り除き、新しい増殖培地に交換し、さらに 2 日間培養した。コンフルエント後、乳分泌誘導培地に交換し、4 日間培養した。なお、乳分泌誘導中はインサートを用いた培養の場合、インサート内層には 1% ペニシリン・ストレプトマイシン・グルタミン混合液含む DMEM/F12 培地を 200 μ L 入れた。乳分泌誘導後、実験に応じて LPS、LTA、炎症性サイトカインあるいは植物エストロゲンを含む乳分泌誘導培地に交換し、さらに 2 日間培養した。なお、乳分泌誘導培地の培地交換は 1 日に 1 度行った。また、LPS および LTA はインサート内層のみに添加し、炎症性サイトカインおよび植物エストロゲンは内層・外層ともに添加した。

10 泌乳期マウスへの植物エストロゲン投与実験

泌乳 7 日目からゲニステイン、ダイズインおよびエクオールを 1 μ g/g (体重) で 1 日 1 回、5 日間腹腔内投与を行った。なお、溶媒として 15% DMSO を含むコーンオイル (Santa Cruz Biotechnology) を用いた。最終投与の 24 時間後、頸椎脱臼によって安楽死させた後、速や

かに第 4 乳腺を採取した。なお、泌乳マウスには 1 匹あたり 9–11 匹の仔マウスを授乳させ、投与開始直前と安楽死直前に母仔の体重を測定した。取り出した乳腺をパラフィン切片作製用、凍結切片作製用、ウェスタンブロットおよび RNA 抽出用に分割した。パラフィン切片作製用の乳腺は 4%パラホルムアルデヒド (PFA, Sigma-Aldrich)/PBS 溶液に浸漬し、4°C で二晩以上固定した。ウェスタンブロット用の乳腺は、液体窒素で凍結させ、–80°C で保存した。凍結切片作製用の乳腺は、OCT コンパウンド (サクラファインテックジャパン) で包埋し、液体窒素で凍結させ、–80°C で保存した。

11 パラフィン切片および凍結切片の作製

パラフィン切片作製用に 4% PFA/PBS で固定した乳腺を固定・包埋用カセット (サクラファインテックジャパン) にセットして、PBS に 15 分間浸した。その後、50%エタノール、70%エタノール、80%エタノール、90%エタノール、95%エタノールにそれぞれ 1 回、99.5% に 2 回、キシレン/エタノール (体積比 1:1) に 1 回、キシレンに 3 回、各 30 分間浸した。続いて 65°C の低温乾燥器 (DX-58、ヤマト科学) 内でパラフィン/キシレン (体積比 1:1) に 1 回、パラフィンに 3 回、各 30 分間浸した。約 65°C のパラフィンを包埋皿の 8 割程度まで流し込み、保冷剤で底を冷やししながら切断面が下になるように乳腺を包埋した。続いて、固定・包埋用カセットの蓋をパラフィンで固定し、–20°C で冷却することによってパラフィンブロックを作製した。作製したパラフィンブロックをマイクローム (REM-710、大和光機工業) で 5 μ m に薄切し、37°C のお湯に浮かべてパラフィン切片を伸展させた後、シランコートされたスライドガラス (武藤化学、76 $\times$ 26 mm) に乗せた。これを伸展器 (KN-210-6、夏目製作所) に置き、37°C で一晩乾燥させ、室温で保存した。

また、OCT コンパウンドで包埋した状態で凍結保存した乳腺を、凍結マイクローム (CM 3050S、LEICA) で 8–10 μ m に薄切し、凍結切片を作製した。作製した凍結切片はシランコートされたスライドガラス (76 $\times$ 26 mm) に乗せ、室温で乾燥させた後に–80°C で保存した。

12 HE 染色

ヘマトキシリン溶液は 1.0 g/L ヘマトキシリン (Merck)、0.2 g/L ヨウ素酸ナトリウム (キシダ化学)、50 g/L カリミョウバン (キシダ化学)、50 g/L 抱水クロラール (米山薬品工業)、1.0 g/L クエン酸 (キシダ化学)を加熱しながら純水に溶解させて調製した。エオジン溶液はエオジン Y (Sigma-Aldrich) 1.0 g をエタノール 78.4 mL に溶解させ、純水 21.6 mL を加えたものを保存液として、使用時に 3 倍量の 80%エタノールで希釈し、100 mL につき 0.5 mL の酢酸を加えたものを使用した。

セルカルチャーインサート上で培養した乳腺上皮細胞あるいは乳腺組織の凍結切片を HE 染色する場合、1% PFA/PBS 溶液に浸漬して、4°C で 10 分間固定を行った。その後、余分な PFA を取り除くため、PBS を入れて室温で 2 分間保持した。乳腺組織のパラフィン切片の場合、キシレンに 3 回、キシレン/エタノール (体積比 1:1) に 1 回、99.5%エタノールに 2 回、90%エタノール、80%エタノール、70%エタノールにそれぞれ 1 回、各 10 分間浸して脱パラフィンおよび親水処理を施した後、PBS に 5 分間以上浸した。続いて、ヘマトキシリン溶液に 10 分間浸した。水道水で 10 分間流水洗浄を行った後、純水で 3 回洗浄した。次にエオジン液に 30 秒間浸し、純水で 3 回洗浄した後、70%エタノール、80%エタノール、90%エタノール、95%エタノールにそれぞれ 1 回、99.5%エタノールに 2 回、キシレン/エタノール (体積比 1:1) に 1 回、キシレンに 3 回、各 1 分間浸した。その後、Entellan new (Merck)を用い、カバーガラス (松浪硝子、24 × 45 mm)を被せて封入した。染色した切片は光学顕微鏡 (BH-2、オリンパス)で観察し、顕微鏡専用デジタルカメラ (DS-5M-L1、ニコン)で撮影した。

13 免疫染色

カバーガラス上もしくはセルカルチャーインサート上で培養した乳腺上皮細胞あるいは

乳腺組織の凍結切片の場合、 -20°C に冷却したメタノール (関東化学) に 10 分間浸漬した。その後、カバーガラス上で培養した乳腺上皮細胞層と乳腺組織の凍結切片はリキッドブロッカー (大道産業) で囲んだ。続いて、1% PFA/PBS 溶液に浸漬し、 4°C で 10 分間固定を行った。余分な PFA を取り除くため、PBS を入れて室温で 2 分間浸漬した。パラフィン切片の場合、脱パラフィンおよび親水処理を施した後、PBS に 5 分間以上浸した。続いて、0.2% Triton X-100 (ナカライテスク)/PBS 溶液を加えて室温で 1 分間浸漬した。その後、PBS で洗浄し、ブロッキング処理を行うため、5% BSA を含む PBS-T (0.05% Tween-20 を含む PBS) に室温で 1.5 時間浸漬した。ブロッキング処理後、細胞層あるいは切片を 2.5% BSA/PBS-T 溶液で希釈した一次抗体に浸して 4°C で一晩反応させた。反応終了後、余分な一次抗体を取り除くために PBS で 3 回速やかに洗浄し、さらに PBS-T で 10 分間ごとの洗浄を 4 回繰り返した後、二次抗体に室温で 1 時間反応させた。なお、二次抗体は 2.5% BSA/PBS-T 溶液で希釈し、核染色のために $2.5\text{ }\mu\text{g/mL}$ DAPI (Sigma-Aldrich) を混合したものを使用した。

反応終了後、一次抗体と同様に PBS と PBS-T で洗浄した。続いて、スライドガラスに Fluoromount (Diagnostic BioSystems) を垂らして封入し、室温で乾燥させ、遮光保存した。なお、セルカルチャーインサートで免疫染色を行った場合、メスを用いて細胞層が形成されているポリエチレンテレフタレート膜を切り抜き、カバーガラスに挟んだ状態で封入した。染色したサンプルは共焦点レーザー顕微鏡 (TCS SP5、LEICA) で観察および撮影を行った。

14 TUNEL 染色

TUNEL 染色には DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Promega) を用いた。パラフィン切片を脱パラフィンおよび親水処理を施した後、PBS に 5 分間以上浸した。続いて、0.2% Triton X-100/PBS 溶液を加えて室温で 1 分間浸漬した。その後、PBS で洗浄し、平衡化のため、Equilibration Buffer に室温で 10 分間浸漬した。TdT 反応溶液 (Equilibration

Buffer : Nucleotide Mix : rTdT Enzyme = 27 μ L : 3 μ L : 0.6 μ L)に浸漬し、37°C で 60 分間、遮光下で反応させた。続いて、2×SSC 溶液に室温で 15 分間浸漬した。PBS で 5 分間ごとの洗浄を 3 回繰り返した後、核染色のために 2.5 μ g/mL DAPI/PBS 溶液に室温で 15 分間浸漬した。洗浄後、スライドガラスに Fluoromount を垂らして封入し、共焦点レーザー顕微鏡で観察および撮影を行った。

15 ウェスタンブロッティングのサンプル調製

培養した乳腺上皮細胞の場合、ウェスタンブロッティング用のサンプルを調製するため、培養終了後に培地を回収し、5 倍濃縮の SDS-PAGE 用サンプルバッファー (125 mM Tris-HCl ; pH 6.8、2%グリセロール、1% 2-メルカプトエタノール ; 和光純薬、0.5% SDS ; 和光純薬、微量のプロモフェノールブルー)と 4:1 (培地:サンプルバッファー)の比率で混合し、2.5%量の 2-メルカプトエタノールを加え攪拌した。続いて、細胞層を回収するため、12 well 細胞培養プレートとインサートの場合、200 μ L のサンプルバッファーを、24 well 細胞培養プレートの場合、各 well に 100 μ L のサンプルバッファーを加えた。その後、2.5%量の 2-メルカプトエタノールを加え、室温で 3 分間振盪した後にピペッティングを行い、細胞を完全に溶解させた後、70°C で 15 分間加熱処理を行った後、-20°C で保存した。

乳腺組織の場合、凍結保存した乳腺からリンパ節を除去した後、氷冷下でメスを用いて細切し、全体をよく混ぜて均質にした。均質化した乳腺 50 mg 程度を 1.5 mL チューブへ移し、500 μ L の RIPA バッファー (Santa Cruz)を加え、ピペッティングを行いながら溶解させた。その後、遠心分離 (10000 g、10 分間)を行い、上清と 5 倍濃縮の SDS-PAGE 用サンプルバッファーを 4:1 の比率で混合し、2.5%量の 2-メルカプトエタノールを加え攪拌した。調製したサンプルは、70°C で 15 分間加熱処理を行った後、-20°C で保存した。

16 膜タンパク質のビオチン標識

細胞膜表面に存在するタンパク質を Biotin-SS-Sulfo-OSu (同仁化学研究所)により標識した。培養終了後、PBS を用いて細胞層を洗浄し、頂端部側細胞膜をビオチン標識する場合はセルカルチャーインサート内層に 1 mg/mL Biotin-SS-Sulfo-OSu/PBS 溶液を滴下し、4°C で 30 分間振盪した。側底部側細胞膜をビオチン標識する場合は、セルカルチャーインサート外層に 1 mg/mL Biotin-SS-Sulfo-OSu/PBS を滴下し、4°C で 30 分間振盪した。

ウェスタンブロッティング用のサンプルを調製する場合、ビオチン標識した細胞層を PBS で洗浄した後、RIPA バッファーを加え、ピペッティングを行いながら溶解させた。遠心分離 (10000 g、10 分間)後、上清に Streptavidin Agarose (Thermo Fisher Scientific)を加えて 4°C で一晩振盪した。Streptavidin Agarose を RIPA バッファーで 2 回洗浄を行った後、SDS-PAGE 用サンプルバッファーに浸漬し、ビオチン標識された膜タンパク質を溶解した。

免疫染色用サンプルの場合、ビオチン標識した細胞層を PBS で洗浄した後、1% PFA/PBS 溶液を滴下し、4°C で 10 分間固定を行った。PBS で洗浄後、「13 免疫染色」と同様の処理で免疫染色を行い、ビオチン標識された膜タンパク質を検出するため、二次抗体溶液に 5 µg/mL fluorescein Avidin D (Vector Laboratories)を加えた。

17 Triton X-100 を用いた TJ タンパク質の分画

TJ タンパク質を TJ 画分とその他の細胞膜/細胞質画分に分画するため、培養した細胞層を PBS で洗浄後、Triton X-100 溶液 (0.1% Triton X-100, 100 mM NaCl, 10 mM HEPES ; pH 7.4, 2 mM EDTA, プロテアーゼ阻害剤 ; ナカライテスク) 100 µL に懸濁した。続いて、20G の注射針とシリンジを用いて 30 回ピペッティングを行い、細胞を溶解させた。遠心分離 (20000 g、30 分間)後、上清を Triton X-100 可溶画分、沈殿を Triton X-100 不溶画分と

してそれぞれ回収し、SDS-PAGE 用サンプルバッファーに溶解してウェスタンブロッティングに供試した。

18 細胞質画分と核画分の分画

核内移行する pSTAT5 の細胞質画分と核画分を分画するため、培養した細胞層を PBS で洗浄後、セルスクレーパーを用いて PBS とともに細胞層を 1.5 mL チューブに回収した。遠心分離 (10000 g、5 分間) 後、沈殿に 100 μ L の核画分分画溶液 (10 mM HEPES; pH7.4、10 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、1 mM DTT、1% NP-40、プロテアーゼ阻害剤) を加えた後、ピペッティングを行った。遠心分離 (20000 g、10 分間) 後、上清は細胞質画分として回収した。沈殿には 500 μ L の核画分分画溶液を加え、20G の注射針とシリンジを用いて 30 回ピペッティングを行った。再度、遠心分離 (500 g、10 分間) を行い、沈殿を核画分として SDS-PAGE 用サンプルバッファーに溶解させ、ウェスタンブロッティングに供試した。

19 乳腺中に蓄積したカゼイン量の測定

泌乳期の乳腺内で乳管や乳腺胞に蓄積した乳汁を回収するため、氷上で乳腺を細切り、1.5 mL チューブに回収した。続いて、乳腺重量の 9 倍量の PBS を加えて 18G の注射針とシリンジを用いて 30 回ピペッティングを行い、蓄積した乳汁を PBS に懸濁させた。遠心分離 (1500 g、5 分間) 後、上清を回収して SDS-PAGE 用サンプルバッファーに調製した。ウェスタンブロッティングにより α -カゼインおよび β -カゼインのバンドを検出し、そのバンドのデンストメトリー解析により乳腺中カゼイン量を測定した。

20 ウェスタンブロッティング

ウェスタンブロッティングを行うため、アクリルアミドゲルを作製して SDS-PAGE を行

った。まず分離ゲル (7–12.5%アクリルアミド、375 mM Tris-HCl; pH8.8、0.1% SDS、0.08% 過硫酸アンモニウム、0.08%テトラメチルエチレンジアミン)を作製し、その上に濃縮ゲル (5%アクリルアミド、125 mM Tris-HCl; pH 6.8、0.1% SDS、0.125%過硫酸アンモニウム、0.125%テトラメチルエチレンジアミン)を重ねた。

ゲルを電気泳動装置 (Bio-Rad)にセットし、ランニングバッファー (25 mM Tris、192 mM グリシン、0.1% SDS)を装置内に加えた。サンプルと分子量マーカー (日本ジェネティクス)を各レーンにアプライし、電気泳動を行った。なお、電流はゲル 1 枚あたり 13 mA とし、電圧は 180 V を超えることがないようにした。

電気泳動終了後、濃縮ゲルを取り除きタンク式ブロッティング装置 (Bio-Rad)にトランスファーバッファー (20%メタノール、25 mM Tris、192 mM グリシン)を加えて、PVDF 膜へタンパク質を転写させた。転写は電圧を 50 V として 4°C で 2.5 時間行った。

転写終了後、PVDF 膜の余分な部分をトリミングし、ブロッキング溶液に浸して室温で 1 時間反応させた。ブロッキング溶液は 4%スキムミルク (和光純薬工業)/PBS-T 溶液を用いた。なお、 β -カゼインとラクトフェリンの検出の場合にはブロッキング溶液として 0.8% BSA と 2%フィッシュゼラチン (Sigma-Aldrich)を含む PBS-T を使用した。ブロッキング処理後、PVDF 膜をシーリングシートではさみ、2.5% BSA/PBS-T 溶液で希釈した一次抗体を適量入れてシーラーで封入した。一次抗体は、4°C で一晩から二晩反応させた。反応終了後、PVDF 膜をシーリングシートから取り出して染色バットに入れ、PBS-T による 10 分間ごとの洗浄を室温で 4 回行った。続いて、ブロッキング溶液で希釈した二次抗体を加えて振盪させながら室温で 45 分間反応させた。反応終了後、再び PBS-T による 10 分間ごとの洗浄を室温で 4 回行った。その後、発光基質溶液である Luminata Forte Western HRP Substrate (Millipore)に 5 分間振盪させながら室温で反応させ、ChemiDoc™ XRS+システム (Bio-Rad)を用いてバンドの検出を行った。検出されたバンドの定量解析には Image Lab (Bio-Rad)の解析ツールを使用した。

21 RNA 抽出および cDNA への逆転写

RNA の抽出には ISOGEN II (和光純薬工業)を用いた。その後、ReverTraAce®qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (東洋紡)を用いてゲノム DNA の除去と cDNA への逆転写を行った。逆転写反応は、37°C で 15 分間と 50°C で 5 分間行い、続けて 98°C で 5 分間熱処理して酵素を失活させた。得られた cDNA は-20°C で保存した。

22 定量 PCR

定量 PCR は SYBR® Green Master Mix (Thunderbird®, 東洋紡) と Light Cycler 480 II (Roche Applied Science) を用いて行った。SYBR® Green Master Mix 5 µL、cDNA Template 0.075 µL、プライマー mix (Forward、Reverse 各 10 µM) 0.5 µL および Nuclease-Free Water 4.625 µL を合わせた 10 µL のスケールで行った。PCR 条件は表 4 に示す。なお、Gluceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*)を内部標準として用いた。プライマーの塩基配列は表 5 に示す。

23 細胞増殖性試験および細胞生存性試験

細胞増殖性および細胞生存性は、96 well 細胞培養用プレートで培養した乳腺上皮細胞を用いて測定した。細胞増殖測定用 WST8 試薬 (キシダ化学)を培地の 10%量添加し、37°C の CO₂ インキュベーター内でさらに 2 時間培養した。反応終了後、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad)で 450 nm における吸光度を測定し、細胞数への影響を評価した。

24 経上皮電気抵抗値の測定

経上皮電気抵抗値の測定は、セルカルチャーインサートで培養した乳腺上皮細胞と Millicel-EPS system (Millipore)を用いて行った。セルカルチャーインサートの内層と外層

表4 PCR条件

	temperature (°C)	time (sec)	cycle	ramp time	acquisition	analysis mode
1. Denature	95	60	1	4.4		none
2. PCR	95	15	45	4.4		quantification
	58	60		2.2	single	
3. Melting	95	5	1	4.4		melting
	58	60		2.2		
	95			0.11	continuous	
4. Cooling	50	30	1	2.2		none

表5 本実験で用いたプライマー配列

Gene	Accession number	Primer Forward	Primer Reverse	Product size
マウス				
<i>Csn1</i>	NM_007784	ccttccctcttgggcttac	tgagggtggatggagaatgga	193
<i>Csn2</i>	NM_009972	cttcagaagggtgaatctcatggg	cagattagcaagactggcaagg	330
<i>Csn3</i>	NM_007786	tcgacccattactccattgtgt	tgtaaaaggtaagggaagacgagaaagat	289
<i>Wap</i>	NM_011709	aacattgggtgttcgaaagc	agggttatcaactggcaactgg	179
<i>Lf</i>	NM_008522	ggctgagaaggcaggaaatg	tttggggctatggctagggtg	183
<i>Glut1</i>	NM_011400	gcttctctctcatcaatcgt	gccgacctctctcttcate	117
<i>Ugp2</i>	NM_139297	tcacaaacaaaacagagcaga	cacttgagcgaattccacca	89
<i>Lalba</i>	NM_010679	accagtggctacgacacac	cggggaactcactacttttacac	106
<i>Slc27a3</i>	NM_011988	tctgggacgattgccagaaac	caagcgcaccttatggteacac	116
<i>Fabp3</i>	NM_010174	agtcaactggtagcgtggacg	aggcagcatgggtctgagctg	230
<i>Srebp1</i>	NM_011480	gtcagcttgtggcagtggag	tctgagggtggagggttaag	90
<i>Prlr short form</i>	NM_001253781.1	gctagagactggctctccaag	ttctcagctttggccaaga	166
<i>Prlr long form</i>	NM_011169.5	ttctctcagagacacgcgg	agcgttctttagttctgctgga	246
<i>Stat5</i>	NM_011488	gcaaaggggatggcgaactt	oggtggaggtgttaactctaa	198
<i>Aqp3</i>	NM_016689	ctggacgcttctactgtgggc	gatctgctcctgtgtttcatg	309
<i>Slc7a5</i>	NM_011404	ccacctgcctctgtctctct	tcttgaatcggagccacatc	127
<i>Gapdh</i>	NM_008084	gagcgagaccccactaacatc	ggggagatgatgacctttt	144
ウシ				
<i>CSN2</i>	XM_010806178.2	TGAAGGTCCTCATCCTTGCCT	CACCAGGTACATTGAGTTCTTCCAG	75
<i>LF</i>	NM_180998.2	ACTATGGCTATACCGGGCT	TGCAGTGCTCTCTCCATTCTG	107
<i>CSN1S1</i>	NM_181029.2	TGTTGAGCAGAAGCACATTCAA	TGGGCATGGATTCCCTCTTTC	165
<i>LALBA</i>	NM_174378.2	AGTTTGCCTGAATGGGTCTGT	AGTGAGGGTTCTGGTCTGCT	142
<i>CD36</i>	NM_001278621.1	GACGATGTACAGCGGTGAT	GGTTGCCAAGAGGTCTGGTT	250
<i>ACSS2</i>	NM_001105339.1	CGTGAACACAAGGCTGTG	GCCTCATGATTTTCCCTGAGC	230
<i>FASN</i>	NM_001012669.1	ACCTCGTGAAGGCTGTGACTCA	TGAGTCGAGGCCAAGGTCTGAA	92
<i>FABP3</i>	NM_174313.2	ATGAAGTCACTCGGTGTCGG	CTGCACGTGGACAAGTTTGC	228
<i>DGAT</i>	NM_174693.2	AGTCTATCACTCCAGTGGGCT	GTAGAGATCGCGGTAGGTCAG	212
<i>CIDEA</i>	NM_001083449.1	TCCTACGACATCCACTGCAC	CCCCTACCCTCTCTTGATCC	192
<i>PERILIPIN2</i>	NM_173980.2	GCGTCTGCTGGCTGATTCT	TGTAAGCCGAGGAGACCAGA	139
<i>XDH</i>	NM_173972.2	GGCCAGATACAAGTTGGCT	AGGACAGGTTGGTCTTGAC	191
<i>IL1B</i>	NM_174093.1	AAAAATCCCTGGTGTGGCT	CATGCAGAACCACTTCTCG	89
<i>TNFA</i>	NM_173966.3	CTCCTTCTCTCTGGTTCAG	CACCTGGGGACTGCTCTTC	92
<i>IL6</i>	NM_173923.2	ACCCAGGCAGACTACTTCT	CCCAGATTGGAAGCATCCGT	195
<i>IL8</i>	NM_173925.2	TGACTTCCAAGCTGGCTGTT	TTTGGGGTGGAAGGTGTGG	140
<i>CCL5</i>	NM_175827.2	CAGAGAAGAAGTGGGTGCGA	GCGCAAGTTCAGGTTCAAGG	81
<i>TLR2</i>	NM_174197.2	ATGATGCTGCCATTCTGATTCT	CTCCAGGTAGGTCTTGGTGTTC	104
<i>TLR4</i>	NM_174198.6	GCACAGACAGAGGTTATGCT	GTTAGGAACAACCTGTACGCA	162
<i>EGFR</i>	XM_002696890.5	TGCACCTATGGCTGTGAAGG	AGCTTGTTGGGAGCTTCTC	237
<i>GAPDH</i>	NM_001034034.2	AAGGTCGGAGTGAACGGATTCT	ATGGCGACGATGTCCACTTT	86

の培地に電極を挿入し、インサート膜上に形成された乳腺上皮細胞層の抵抗値を測定した。ブランクとして乳腺上皮細胞を播種していないセルカルチャーインサートの抵抗値を測定した。なお、抵抗値の測定は培養温度の変化による影響を考慮し、37°C に設定した伸展板上で行った。

25 FITC 透過性の測定

乳腺上皮細胞層の小分子透過性に対する各植物エストロゲンの影響について、セルカルチャーインサートで培養した乳腺上皮細胞と FITC (分子量 376; Sigma-Aldrich)を用いて調べた。植物エストロゲンを含む分化培地 (フェノールレッド不含)で 2 日間培養した後、最終濃度 0.1 mg/mL となるよう、内層に FITC を含む培地を 10 μ L 加え、インキュベーター内でさらに 2 時間培養した。その後、セルカルチャーインサート外層の培地を回収し、蛍光プレートリーダー (ARVO MX)で 492/520 nm における蛍光強度を測定した。なお、数値は植物エストロゲン未処理群であるコントロール群との相対値で算出した。

26 細胞内および培地中トリグリセリド量の測定

トリグリセリド量の測定には Adipogenesis Assay Kit (BioVision)を用いた。培地中のトリグリセリド量を測定する場合、セルカルチャーインサート内層の培地 50 μ L を 200 μ L PCR チューブに回収し、Lipid Extraction 溶液を同量加えた。また、細胞内トリグリセリド量を測定する場合、培養した乳腺上皮細胞をコラーゲンゲルごと 200 μ L PCR チューブに回収し、Lipid Extraction 溶液を 100 μ L 加えた。その後、95°C で 30 分間加熱処理を行い、トリグリセリドを抽出した。続いて、トリグリセリド抽出サンプルを 25 μ L ずつ 96 well プレートに分注し、各 well に Lipase 1 μ L を添加して室温で 30 分間反応させた。その後、トリグリセリド反応溶液 (Assay Buffer : Probe : Enzyme mix = 23 μ L : 1 μ L : 1 μ L)を各

well に添加し、37°C で 30 分間、遮光下で静置した。反応終了後、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad) で 540 nm における吸光度を測定した。なお、各サンプルのブランクにはそれぞれのトリグリセリド抽出サンプル、検量線のブランクには Assay Buffer を使用した。

27 培地中乳糖濃度の測定

培地中の乳糖濃度の測定は Lactose/D-Galactose キット (J.K.インターナショナル) を用いた紫外部吸光度測定法により行った。培養終了後、セルカルチャーインサート内層の培地 100 μ L を 1.5 mL チューブに回収した。溶液 I (クエン酸緩衝液、pH 6.6) 20 μ L および溶液 II (β -ガラクトシダーゼ溶液) 5 μ L を添加し、振盪後、室温で 30 分間静置した。その後、溶液 III (ピロリン酸カリウム緩衝液、pH 8.6) 100 μ L および溶液 IV (β -ガラクトースデヒドロゲナーゼ溶液) 5 μ L を添加し、振盪後、30 分間静置した。反応終了後、溶液の吸光度 (340 nm) を紫外可視分光光度計 (V-630Bio UV-Vis Spectrophotometer、JASCO Corporation) で測定した。なお、ブランクには溶液 IV による反応を行っていないサンプルを使用した。

28 統計解析

数値データは $n=4$ 以上の平均値とし、統計分析はスチューデントの t 検定もしくはチューキーの検定を用い、 $p<0.05$ を有意とした。また、再現性を確かめるため、異なるマウスもしくはウシによる独立した培養実験を 3 回以上行った。

第七章 要約

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。植物エストロゲンとは卵胞ホルモン類似物の総称である。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前述の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。これまでの研究から、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は明らかになっていない。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体系化することを目的として、3段階の研究を遂行した。

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判明した。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明らかになった。

続いて、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ゲル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判明した。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。さらに、作製した乳分泌モデルを用いることで、乳房炎起炎菌毒素がウシ乳腺上皮細胞の乳産生に関わる膜タンパク質の局在を短期的に変化させていることも新たに見出された。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。

最後に、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明らかになった。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 AKT 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明らかになった。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判明した。

本研究では、マメ科植物に含まれる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明らかになった。加えて、興味深いことに、植物エストロゲンの代謝経路の上流から下流に向かって、各植物エストロゲンの乳産生への影響は阻害的作用から促進的作用に変化していた。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。本研究で作製した乳分泌モデルは生体反映性の高いモデルであり、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。今後はウシの乳生産性を調節する生理活性物質のスクリーニング実験や個体レベルでは検証が困難な乳産生メカニズムの解明に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。

第八章 謝辞

本研究を遂行するにあたり、多くの方のご指導を頂きました。学位論文審査にあたり、御校閲を賜りました北海道大学大学院農学研究院 中村富美男名誉教授、西邑隆徳教授、高橋昌志教授に深く御礼申し上げます。指導教官である小林謙准教授には終始、丁寧かつ熱心なご指導を頂きました。深く御礼申し上げます。

乾乳期ホルスタイン牛の乳腺採取にあたり、ご協力を賜りました北海道大学大学院獣医学研究院 柳川洋二郎助教ならびに北海道大学北方圏フィールド科学センター生物生産研究農場の皆様に深く御礼申し上げます。

泌乳期ホルスタイン牛の乳腺採取にあたり、ご協力を賜りました国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所北海道支所 渡部淳先生に深く御礼申し上げます。

共焦点顕微鏡の使用にあたり、ご指導を賜りました北海道大学大学院農学研究院生物組織構造センター 安井雅範様に深く御礼申し上げます。

最後に、研究室での日々を有意義なものにしてくれた同期の松長君と橋本君をはじめとする細胞組織生物学的研究室ならびに酪農食品科学研究室の皆様に深く感謝致します。

第九章 参考文献

- Abate W, Alghaithy A, Parton J, Jones P and Jackson K. 2010. Surfactant lipids regulate LPS-induced interleukin-8 production in A549 lung epithelial cells by inhibiting translocation of TLR4 into lipid raft domains. *The Journal of Lipid Research* **51**, 334-344.
- Adams M, Lucas J, Kapur P and Stevens M. 2007. LPS induces translocation of TLR4 in amniotic epithelium. *Placenta* **28**, 477-481.
- Akira S, Takeda K and Kaisho T. 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunology* **2**, 675-680.
- Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M and Fukami Y. 1987. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *Journal of Biological Chemistry* **262**, 5592-5595.
- Andersen C, Nielsen S, Purup S, Kristensen T, Eriksen J, Soegaard K, Sorensen J and Frette C. 2009. Phyto-oestrogens in herbage and milk from cows grazing white clover, red clover, lucerne or chicory-rich pastures. *Animal* **3**, 1189-1195.
- Anderson M, Rudolph C, Mcmanaman L and Neville C. 2007. Key stages in mammary gland development. Secretory activation in the mammary gland: it's not just about milk protein synthesis! *Breast Cancer Research* **9**, 204.
- Bannerman D. 2009. Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. *Journal of Animal Science* **87**, 10-25.
- Bannerman D, Paape J, Lee W, Zhao X, Hope C and Rainard P. 2004. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **11**, 463-472.
- Batterham J, Hart K and Lamberton A. 1965. Metabolism of oestrogenic isoflavones in sheep. *Nature* **206**, 509.

Baumgartner K, Rudolph C, Ramanathan P, Burns V, Webb P, Bitler G, Stein T, Kobayashi K and Neville C. 2017. Developmental expression of claudins in the mammary gland. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* **22**, 141-157.

Bertucci Y, Quaglino A, Pozzi G, Kordon C and Pecci A. 2010. Glucocorticoid-induced impairment of mammary gland involution is associated with STAT5 and STAT3 signaling modulation. *Endocrinology* **151**, 5730-5740.

Bjornstrom L and Sjoberg M. 2005. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Molecular Endocrinology* **19**, 833-842.

Blanchard A, Warson H, Shiu P, Leygue E, Nistor A, Wong P and Myal Y. 2006. Differential expression of claudin 1, 3, and 4 during normal mammary gland development in the mouse. *DNA and Cell Biology* **25**, 79-86.

Bottner M, Thelen P and Jarry H. 2014. Estrogen receptor beta: tissue distribution and the still largely enigmatic physiological function. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **139**, 245-251.

Bradley A. 2002. Bovine mastitis: an evolving disease. *The Veterinary Journal* **164**, 116-128.

Branca F and Lorenzetti S. 2005. Health effects of phytoestrogens. *Forum of Nutrition* 100-111.

Briskin C and O'maller B. 2010. Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2**, a003178.

Broderick A. 2018. Utilization of protein in red clover and alfalfa silages by lactating dairy cows and growing lambs. *Journal of Dairy Science* **101**, 1190-1205.

Broderick A, Faciola P and Armentano E. 2015. Replacing dietary soybean meal with canolameal improves production and efficiency of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* **98**, 5672-5687.

Camps M, Vilaro S, Testar X, Palacin M and Zorzano A. 1994. High and polarized expression of GLUT1 glucose transporters in epithelial cells from mammary gland: acute down- regulation of GLUT1 carriers by weaning. *Endocrinology* **134**, 924-934.

Castro L, Gao X, Moore B, Yu L, Di X, Kissling E and Dixon D. 2016. A high concentration of genistein induces cell death in human uterine leiomyoma cells by autophagy. *Expert Opinion on Environmental Biology Journal* **5**.

Cerbulis J and Farrell M. 1975. Composition of milks of dairy cattle. I. Protein, lactose, and fat contents and distribution of protein fraction. *Journal of Dairy Science* **58**, 817-827.

Cereijido M, Valdes J, Shoshani L and Contreras G. 1998. Role of tight junctions in establishing and maintaining cell polarity. *Annual Review of Physiology* **60** 161-177.

Cools S, Broeck W, Vanhaecke L, Heyerick A, Bossaert P, Hostens M and Opsomer G. 2014. Feeding soybean meal increases the blood level of isoflavones and reduces the steroidogenic capacity in bovine corpora lutea, without affecting peripheral progesterone concentrations. *Animal Reproduction Science* **144**, 79-89.

Cotrim Z, Fabris V, Doria L, Lindberg K, Gustafsson A, Amado F, Lanari C and Helguero A. 2013. Estrogen receptor beta growth-inhibitory effects are repressed through activation of MAPK and PI3K signalling in mammary epithelial and breast cancer cells. *Oncogene* **32**, 2390-2402.

Day J, Dupont S, Ridley S, Rhodes M, Rhodes J, Morgan R and Williamson G. 1998. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *FEBS Letters* **436**, 71-75.

Delgado E, Grabinger T and Brunner T. 2016. Cell death at the intestinal epithelial front line. *The FEBS Journal* **283**, 2701-2719.

Derakhshani H, Fehr B, Sepehri S, Francoz D, Debuck J, Barkema W, Plaizier C and Khafipour E. 2018. Invited review: Microbiota of the bovine udder: Contributing factors and potential implications for udder health and mastitis susceptibility. *Journal of Dairy Science* **101**, 10605-10625.

Dixon A. 2004. Phytoestrogens. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 225-261.

Ezzat M, Quinteka-baluja M, Bohme K, Fernandez-no I, Caamano-antelo S, Calo-mata P and Barros-velazquez J. 2014. The immunology of mammary gland of dairy ruminants between healthy and inflammatory conditions. *The Journal of Veterinary Medical Science* **2014**, 659801.

Fernandez-ballart J, Gordillo J, Arijia V and Marti-henneberg C. 1989. Food consumption, feeding habits and nutritional status of the population of Reus. Diet and nutritional balance in people older than 60 years of age. *Revista Clínica Española* **185**, 282-290.

Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S and Tsukita S. 1993. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *Journal of Cell Biology* **123**, 1777-1788.

Gardner D, Chatterjee M and Franke A. 2009. Effects of isoflavone supplements vs. soy foods on blood concentrations of genistein and daidzein in adults. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **20**, 227-234.

Gencel B, Benjamin M, Bahou N and Khalil A. 2012. Vascular effects of phytoestrogens and alternative menopausal hormone therapy in cardiovascular disease. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **12**, 149-174.

Gilbert B, Cunha P, Jensen K, Glass J, Foucars G, Robert-granie C, Rupp R and Rainard P. 2013. Differential response of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* or *Escherichia coli* agonists of the innate immune system. *Veterinary Research* **44**, 40.

Gopaul R, Knaggs E and Lephart D. 2012. Biochemical investigation and gene analysis of equol: a plant and soy-derived isoflavonoid with antiaging and antioxidant properties with potential human skin applications. *BioFactors* **38**, 44-52.

Grohn T, Wilson J, Gonzalez N, Hertl A, Schulte H, Bennett G and Schukken H. 2004. Effect of pathogen-specific clinical mastitis on milk yield in dairy cows. *Journal of Dairy Science* **87**, 3358-3374.

Gross J, Van A, Wellntiz O and Bruckmaier 2015. Glucose transport and milk secretion during manipulated plasma insulin and glucose concentrations and during LPS-induced mastitis in dairy cows. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **99**, 747-756.

Gunther J, Petzl W, Zerbe H, Schuberth J, Koczan D, Goetze L and Seyfert M. 2012. Lipopolysaccharide priming enhances expression of effectors of immune defence while decreasing expression of pro-inflammatory cytokines in mammary epithelia cells from cows. *BMC Genomics* **13**, 17.

Hertl A, Schukken H, Bar D, Bennett J, Gonzalez N, Rauch J, Welcome L, Tauer W and Grohn T. 2011. The effect of recurrent episodes of clinical mastitis caused by gram-positive and gram-negative bacteria and other organisms on mortality and culling in Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science* **94**, 4863-4877.

Hooper B, Silva S, De A, Meringhe F, Lacasse P and Negrao A. 2020. Effect of heat stress in late gestation on subsequent lactation performance and mammary cell gene expression of Saanen goats. *Journal of Dairy Science* **103**, 1982-1992.

Jensen K, Gunther J, Talbot R, Petzl W, Zerbe H, Schuberth J, Seyfert M and Glass J. 2013. *Escherichia coli*- and *Staphylococcus aureus*-induced mastitis differentially modulate transcriptional responses in neighbouring uninfected bovine mammary gland quarters. *BMC Genomics* **14**, 36.

Johnzon F, Dahlberg J, Gustafson M, Waern I, Moazzami A, Ostensson K and Pejler G. 2018. The effect of lipopolysaccharide-induced experimental bovine mastitis on clinical parameters, inflammatory markers, and the metabolome: A kinetic approach. *Frontiers in Immunology* **9**, 1487.

Kaushik S, Shyam H, Sharma R and Balapure K. 2018. Dietary isoflavone daidzein synergizes centchroman action via induction of apoptosis and inhibition of PI3K/Akt pathway in MCF-7/MDA MB-231 human breast cancer cells. *Phytomedicine* **40**, 116-124.

Kawai T and Akira S. 2006. TLR signaling. *Cell Death and Differentiation* **13**, 816-825.

Kiatprasert P, Deachapunya C, Benjanirat C and Poonyachoti S. 2015. Soy isoflavones improves endometrial barrier through tight junction gene expression. *Reproduction* **149**, 269-280.

Kobayashi K, Kuki C, Oyama S and Kumura H. 2016a. Pro-inflammatory cytokine TNF- α is a key inhibitory factor for lactose synthesis pathway in lactating mammary epithelial cells. *Experimental Cell Research* **340**, 295-304.

Kobayashi K and Kumura H. 2011. Distinct behavior of claudin-3 and -4 around lactation period in mammary alveolus in mice. *Histochemistry and Cell Biology* **136**, 587-594.

Kobayashi K, Miwa H and Yasui M. 2010. Inflammatory mediators weaken the amniotic membrane barrier through disruption of tight junctions. *The Journal of Physiology* **588**, 4859-4869.

Kobayashi K, Oyama S, Kuki C, Tsugami Y, Matsunaga K, Suzuki T and Nishimura T. 2017. Distinct roles of prolactin, epidermal growth factor, and glucocorticoids in beta-casein secretion pathway in lactating mammary epithelial cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* **440**, 16-24.

Kobayashi K, Oyama S, Uejyo T, Kuki C, Rahman M and Kumura H. 2013. Underlying mechanisms involved in the decrease of milk secretion during *Escherichia coli* endotoxin induced mastitis in lactating mice. *Veterinary Research* **44**, 119.

Kobayashi K, Tsugami Y, Matsunaga K, Oyama S, Kuki C and Kumura H. 2016b. Prolactin and glucocorticoid signaling induces lactation-specific tight junctions concurrent with beta-casein expression in mammary epithelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta- Molecular and Cell Biology of Lipids* **1863**, 2006-2016.

Kolosov D, Bui P, Chasiotis H and Kelly P. 2013. Claudins in teleost fishes. *Tissue Barriers* **1**, e25391.

Kowalczyk-zieba I, Woclawek-potocka I, Piskula K, Piotrowska-tomala K, Boruszewska D, Bah M, Siemieniuch J and Skarzynski J. 2011. Experimentally induced mastitis and metritis modulate soy bean derived isoflavone biotransformation in dairy cows. *Theriogenology* **76**, 1744-1755.

Kumar S, Clarke R, Hooper L, Horne S, Law J, Leaver J, Springbett A, Stevenson E and Simons P. 1994. Milk composition and lactation of beta-casein-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 6138-6142.

Lamote I, Meyer E, Massart-leen M and Burvenich C. 2004. Sex steroids and growth factors in the regulation of mammary gland proliferation, differentiation, and involution. *Steroids* **69**, 145-159.

Laplante D, Catanese C, Bansal R and Vandwnberg N. 2017. Bisphenol S alters the lactating mammary gland and nursing behaviors in mice exposed during pregnancy and lactation. *Endocrinology* **158**, 3448-3461.

Lee Y, Lee W, Kaetzel S, Parry G and Bissell J. 1985. Interaction of mouse mammary epithelial cells with collagen substrata: regulation of casein gene expression and secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**, 1419-1423.

Lesueur L, Edery M, Ali S, Paly J, Kelly P and Djiane J. 1991. Comparison of long and short forms of the prolactin receptor on prolactin-induced milk protein gene transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 824-828

Levy E and Darnell E. 2002. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **3**, 651-662.

Li Y, Cao Y, Wang J, Fu S, Cheng J, Ma L, Zhang Q, Guo W, Kan X and Liu J. 2020. Kp-10 promotes bovine mammary epithelial cell proliferation by activating GPR54 and its downstream signaling pathways. *Journal of Cellular Physiology* **235**, 4481-4493.

Lin Y, Duan X, Lv H, Yang Y, Liu Y, GaoX and HouX. 2018. The effects of L-type amino acid transporter 1 on milk protein synthesis in mammary glands of dairy cows. *Journal of Dairy Science* **101**, 1687-1696.

Linzell L and Peaker M. 1974. Changes in colostrum composition and in the permeability of the mammary epithelium at about the time of parturition in the goat. *The Journal of Physiology* **243**, 129-151.

Liu D, Jiang H and Grange W. 2005. Genistein activates the 3',5'-cyclic adenosine monophosphate signaling pathway in vascular endothelial cells and protects endothelial barrier function. *Endocrinology* **146**, 1312-1320.

Liu S, Hsieh D, Yang L, Xu Z, Peto C, Jablons M and You L. 2013. Coumestrol from the national cancer Institute's natural product library is a novel inhibitor of protein kinase CK2. *BMC Pharmacology and Toxicology* **14**, 36.

Lookhart L. 1980. Analysis of coumestrol, a plant estrogen, in animal feeds by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **28**, 666-667.

Ludewig T. 1996. Light and electron microscopic investigations of the blood-milk barrier in lactating cow udders. *Anatomia, Histologia, Embryologia* **25**, 121-126.

Lundh T. 1995. Metabolism of estrogenic isoflavones in domestic animals. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **208**, 33-39.

Mallepell S, Kryst A, Chambon P and Brisken C. 2006. Paracrine signaling through the epithelial estrogen receptor alpha is required for proliferation and morphogenesis in the mammary gland. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 2196-2201.

Manna K. 2012. Double-edged sword effect of biochanin to inhibit nuclear factor kappaB: suppression of serine/threonine and tyrosine kinases. *Biochemical Pharmacology* **83**, 1383-1392.

Martin-perez J, Garcia-martinez M, Sanchez-bailon P, Mayoral-varo V and Calcabrini A. 2015. Role of SRC family kinases in prolactin signaling. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **846**, 163-188.

Masson-boivin C, Giraud E, Perret X and Batut J. 2009. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends in Microbiology* **17**, 458-466.

Mathey J, Lamothe V, Coxam V, Potier M, Sauvant P and Bennetau-pelissero C. 2006. Concentrations of isoflavones in plasma and urine of post-menopausal women chronically ingesting high quantities of soy isoflavones. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **41**, 957-965.

Matunaga K, Tsugami Y, Kumai A, Suzuki T, Nishimura T and Kobayashi K. 2018. IL-1 β directly inhibits milk lipid production in lactating mammary epithelial cells concurrently with enlargement of cytoplasmic lipid droplets. *Experimental Cell Research* **370**, 365-372.

Matsuzaki T, Machida N, Tajika Y, Ablimit A, Suzuki T, Aoki T, Hagiwara H and Takata K. 2005. Expression and immunolocalization of water-channel aquaporins in the rat and mouse mammary gland. *Histochemistry and Cell Biology* **123**, 501-512.

Mayr U, Butsch A and Schneider S. 1992. Validation of two in vitro test systems for estrogenic activities with zearalenone, phytoestrogens and cereal extracts. *Toxicology* **74**, 135-149.

Mazur W. 1998. Phytoestrogen content in foods. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism* **12**, 729-742.

Mccarthy M, Skare B, Stankewich C, Furuse M, Tsukita S, Rogers A, Lynch D and Schneeberger E. 1996. Occludin is a functional component of the tight junction. *Journal of Cell Science* **109**, 2287-2298.

Michel T, Halabalki M and Skaltsuounis L. 2013. New concepts, experimental approaches, and dereplication strategies for the discovery of novel phytoestrogens from natural sources. *Planta Medica* **79**, 514-532.

Mineta K, Yamamoto Y, Yamazaki Y, Tanaka H, Tada Y, Saito K, Tamura A, Igarashi M, Endo T, Takeuchi K and Tsukita S. 2011. Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Letters* **585**, 606-612.

Mishra P, Kar A and Kale K. 2009. Modulatory influence of prepubertal biochanin A exposure on mammary gland differentiation and expression of estrogen receptor- α and apoptotic proteins. *Phytotherapy Research* **23**, 972-979.

Mishra P, Kar A and Kale K. 2011. Prepubertal daidzein exposure enhances mammary gland differentiation and regulates the expression of estrogen receptor- α and apoptotic proteins. *ISRN Oncology* **2011**, 896826.

Mohammad A, Hadsell L and Haymond W. 2012. Gene regulation of UDP-galactose synthesis and transport: potential rate-limiting processes in initiation of milk production in humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **303**, E365-376.

Moon J, Seok H, Kim S, Rhee S, Lee D, Yang Y, Chae Y, Kim H, Kim Y, Chung Y, Kim M and Chung S. Y. 2009. Lactational coumestrol exposure increases ovarian apoptosis in adult rats. *Archives of Toxicology* **83**, 601-608.

Moorby M, Ellis M and Davies R. 2016. Assessment of dietary ratios of red clover and corn silages on milk production and milk quality in dairy cows. *Journal of Dairy Science* **99**, 7982-7992.

Mustonen A, Tuori M, Saastamoinen I, Tapoken J, Wahala K, Saloniemi H and Vanhatalo A. 2009. Equol in milk of dairy cows is derived from forage legumes such as red clover. *British Journal of Nutrition* **102**, 1552-1556.

Nishikawa S, Moore C, Nonomura N and Oka T. 1994. Progesterone and EGF inhibit mouse mammary gland prolactin receptor and beta-casein gene expression. *American Journal of Physiology* **267**, C1467-C1472.

Noda S, Tanabe S and Suzuki T. 2012. Differential effects of flavonoids on barrier integrity in human intestinal Caco-2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**, 4628-4633.

Nuijens H, Vav H and Schanbacher L. 1996. Structure and biological actions of lactoferrin. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* **1**, 285-295.

Nursoy H, Ronquillo G, Faciola P and Broderick A. 2018. Lactation response to soybean meal and rumen-protected methionine supplementation of corn silage-based diets. *Journal of Dairy Science* **101**, 2084-2095.

Obiorah E, Fan P and Jordan C. 2014. Breast cancer cell apoptosis with phytoestrogens is dependent on an estrogen-deprived state. *Cancer Prevention Research* **7**, 939-949.

Pelletier G and El-alfy. 2000. Immunocytochemical localization of estrogen receptors alpha and beta in the human reproductive organs. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **85**, 4835-4840.

Pfitscher A, Reiter E and Jungbauer A. 2008. Receptor binding and transactivation activities of red clover isoflavones and their metabolites. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **112**, 87-94.

Pieghokdt S, Pallauf K, Esatbeyoglu T, Speck N, Reiss K., Ruddigkeit L, Stocker A., Huebbe P and Rimbach G. 2014. Biochanin A and prunetin improve epithelial barrier function in intestinal CaCo-2 cells via downregulation of ERK, NF-kappaB, and tyrosine phosphorylation. *Free Radical Biology and Medicine* **70**, 255-264.

Pilsakova L, Rieicansky I and Jagla F. 2010. The physiological actions of isoflavone phytoestrogens. *Physiological Research* **59**, 651-664.

Pitelka R, Hamamoto T, Duafala G and Nemanic K. 1973. Cell contacts in the mouse mammary gland. I. Normal gland in postnatal development and the secretory cycle. *Journal of Cell Biology* **56**, 797-818.

Rahal M and Simmen C. 2010. PTEN and p53 cross-regulation induced by soy isoflavone genistein promotes mammary epithelial cell cycle arrest and lobuloalveolar differentiation. *Carcinogenesis* **31**, 1491-500.

Ramakrishnan B and Qasba K. 2001. Crystal structure of lactose synthase reveals a large conformational change in its catalytic component, the beta1,4-galactosyltransferase-I. *Journal of Molecular Biology* **310**, 205-218.

Ramakrishnan B, Shah S and Qasba K. 2001. α -Lactalbumin (LA) stimulates milk beta-1,4-galactosyltransferase I (beta 4Gal-T1) to transfer glucose from UDP-glucose to N-acetylglucosamine. Crystal structure of beta 4Gal-T1 x LA complex with UDP-Glc. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 37665-37671.

Reichardt M, Horsch K, Grone J, Kolbus A, Beug H, Hynes N and Schutz G. 2001. Mammary gland development and lactation are controlled by different glucocorticoid receptor activities. *European Journal of Endocrinology* **145**, 519-527.

Riskin A, Nannegari H and Mond Y. 2008. Acute effectors of GLUT1 glucose transporter subcellular targeting in CIT3 mouse mammary epithelial cells. *Pediatric Research* **63**, 56-61.

Rodriguez A, Liang H, Chen Y, Plascencia-villa G and Perry G. 2019. Single-channel permeability and glycerol affinity of human aquaglyceroporin AQP3. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **1861**, 768-775.

Rowson R, Daniels M, Ellis E and Hovey C. 2012. Growth and development of the mammary glands of livestock: a veritable barnyard of opportunities. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **23**, 557-566.

Rudolph C, Mcmanaman L, Hunter L, Phang T and Neville C. 2003. Functional development of the mammary gland: use of expression profiling and trajectory clustering to reveal changes in gene expression during pregnancy, lactation, and involution. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* **8**, 287-307.

Rudolph C, Monks J, Burns V, Phistry M, Mariani R, Foote R, Bauman E, Anderson M and Neville C. 2010. Sterol regulatory element binding protein and dietary lipid regulation of fatty acid synthesis in the mammary epithelium. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **299**, E918-E927.

Rudolph C, Neville C and Anderson M. 2007. Lipid synthesis in lactation: diet and the fatty acid switch. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* **12**, 269-281.

Ruegg L. 2017. A 100-year review: Mastitis detection, management, and prevention. *Journal of Dairy Science* **100**, 10381-10397.

Sakamoto K, Komatsu T, Kobayashi T, Rose T, Aso H, Hagino A and Obara Y. 2005. Growth hormone acts on the synthesis and secretion of alpha-casein in bovine mammary epithelial cells. *Journal of Dairy Research* **72**, 264-270.

Shin K, Fogg C and Margolis B. 2006. Tight junctions and cell polarity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **22**, 207-235.

Signorelli S, Sainz M, Tabares S and Monza J. 2020. The role of nitric oxide in nitrogen fixation by legumes. *Frontiers in Plant Science* **11**, 521.

Singh K, Vetharanim I, Dobson M, Prewitz M, Oden K, Murney R, Swanson M, McDonald R, Henderson V and Stelwagen K. 2016. Cell survival signaling in the bovine mammary gland during the transition from lactation to involution. *Journal of Dairy Science* **99**, 7523-7543.

Sirotkin V and Harrath H. 2014. Phytoestrogens and their effects. *European Journal of Pharmacology* **741**, 230-236.

Snyder M, Huang J, Huang Y and Zhang J. 2014. A signal transducer and activator of transcription 3.Nuclear Factor kappaB (Stat3.NFkappaB) complex is necessary for the expression of fascin in metastatic breast cancer cells in response to interleukin (IL)-6 and tumor necrosis factor (TNF)-alpha. *Journal of Biological Chemistry* **289**, 30082-30089.

Soni M, Rahardjo B, Soekardi R, Sulistoyowati Y, Lestariningsih A, Irsab A and Hogervorst E. 2014. Phytoestrogens and cognitive function: a review. *Maturitas* **77**, 209-220.

Sorensen T, Norgaard V, Theil K, Vestergaard M and Sejrsen K. 2006. Cell turnover and activity in mammary tissue during lactation and the dry period in dairy cows. *Journal of Dairy Science* **89**, 4632-4639.

Speer E, Gunasekara B, Wang Y, Fallon K, Attayek J, Smith C, Sims E and Allbritton L. 2019. Molecular transport through primary human small intestinal monolayers by culture on a collagen scaffold with a gradient of chemical cross-linking. *Journal of Biological Engineering* **13**, 36.

Stahl A. 2004. A current review of fatty acid transport proteins (SLC27). *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* **447**, 722-727.

Stewart F, Bonsing J, Beattie W, Shah F, Willis M and Mackinlay G. 1987. Complete nucleotide sequences of bovine alpha S2- and beta-casein cDNAs: comparisons with related sequences in other species. *Molecular Biology and Evolution* **4**, 231-241.

Suzuki T and Hara H. 2009. Quercetin enhances intestinal barrier function through the assembly of zonula [corrected] occludens-2, occludin, and claudin-1 and the expression of claudin-4 in Caco-2 cells. *The Journal of Nutrition* **139**, 965-974.

Szkudelska K and Nogowski L. 2007. Genistein--a dietary compound inducing hormonal and metabolic changes. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **105**, 37-45.

Thornton J. 2013. Estrogens and aging skin. *Dermato-Endocrinology* **5**, 264-270.

Truchet S and Ollivier-bousquet M. 2009. Mammary gland secretion: hormonal coordination of endocytosis and exocytosis. *Animal* **3**, 1733-1742.

Tsukita S and Furuse M. 2000a. Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *Journal of Cell Biology* **149**, 13-16.

Tsukita S and Furuse M. 2000b. The structure and function of claudins, cell adhesion molecules at tight junctions. *Annals of the New York Academy of Sciences* **915**, 129-135.

Uejyo T, Kuki C, Oyama S, Kumura H and Kobayashi K. 2015. Early down-regulation of milk production after weaning by pup removal and prior to involution in mouse mammary glands. *Cell and Tissue Research* **359**, 643-653.

Wang D, Cai J, Zhao F and Liu J. 2019. Low-quality rice straw forage increases the permeability of mammary epithelial tight junctions in lactating dairy cows. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **99**, 2037-2041.

Watanabe S, Yamaguchi M, Sobue T, Takahashi T, Miura T, Arai Y, Mazur W, Wahala K and Adlercreutz H. 1998. Pharmacokinetics of soybean isoflavones in plasma, urine and feces of men after ingestion of 60 g baked soybean powder (kinako). *Journal of Nutrition* **128**, 1710-1715.

Watson J and Burdon G. 1996. Prolactin signal transduction mechanisms in the mammary gland: the role of the Jak/Stat pathway. *Reviews of Reproduction* **1**, 1-5.

Weis E and Raetzman T. 2019. Genistein inhibits proliferation and induces senescence in neonatal mouse pituitary gland explant cultures. *Toxicology* **427**, 152306.

Woclawek-potocka I, Piskula K, Bah M, Siemieniuch J, Korzekwa A, Brzezicka E and Skarzynski J. 2008. Concentrations of isoflavones and their metabolites in the blood of pregnant and non-pregnant heifers fed soy bean. *Journal of Reproduction and Development* **54**, 358-563.

Worster T, Schmelzle T, Solimini L, Lightcap S, Millard B, Mills B, Brugge S and Albeck G. 2012. Akt and ERK control the proliferative response of mammary epithelial cells to the growth factors IGF-1 and EGF through the cell cycle inhibitor p57Kip2. *Science Signaling* **5**, ra19.

Wu Y, Xu H, Wu F, Chen C, Liu Y, Wu N, Yao Q, Liu K, Li G and Shen L. 2015. Formononetin, a novel FGFR2 inhibitor, potently inhibits angiogenesis and tumor growth in preclinical models. *Oncotarget* **6**, 44563-44578.

Wuttke W, Jarry H, Westphalen S, Christoffel V and Seidlova-wuttke D. 2002. Phytoestrogens for hormone replacement therapy? *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **83**, 133-147.

Wyszomierski L, Yeh J and Rosen M. 1999. Glucocorticoid receptor/signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) interactions enhance STAT5 activation by prolonging STAT5 DNA binding and tyrosine phosphorylation. *Molecular Endocrinology* **13**, 330-343.

Xu T, Dong Z, Wang X, Qi S, Li X, Cheng R, Liu X, Zhang Y and Gao Q. 2018. IL-1 β induces increased tight junction permeability in bovine mammary epithelial cells via the IL-1 β -ERK1/2-MLCK axis upon blood-milk barrier damage. *Journal of Cellular Biochemistry* **119**, 9028-9041.

Yang W, Zerbe H, Petzl W, Brunner M, Gunther J, Draing C, Von S, Schuberth J and Seyfert M. 2008. Bovine TLR2 and TLR4 properly transduce signals from *Staphylococcus aureus* and *E. coli*, but *S. aureus* fails to both activate NF- κ B in mammary epithelial cells and to quickly induce TNF α and interleukin-8 (CXCL8) expression in the udder. *Molecular Immunology* **45**, 1385-1397.

Yasui H, Kubota M, Iguchi K, Usui S, Kiho T and Hirano K. 2008. Membrane trafficking of aquaporin 3 induced by epinephrine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **373**, 613-617.

Younes M and Honma N. 2011. Estrogen receptor beta. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* **135**, 63-66.

Yu Q, Zhu L, Lin J, Zhang Q, Tian Q, Hu W and Yang Q. 2013. Functional analyse of GLUT1 and GLUT12 in glucose uptake in goat mammary gland epithelial cells. *PLOS ONE* **8**, e65013.

Zafar A, Singh S and Naseem I. 2017. Cytotoxic activity of soy phytoestrogen coumestrol against human breast cancer MCF-7 cells: Insights into the molecular mechanism. *Food and Chemical Toxicology* **99**, 149-161.

Zhang C, Zhai S, Wu L, Bai Y, Jia J, Zhang Y, Zhang B and Yan B. 2015. Induction of size-dependent breakdown of blood-milk barrier in lactating mice by TiO₂ nanoparticles. *PLOS ONE* **10**, e0122591.

Zhang J, Ren L, Yu M, Liu X, Ma W, Huang L, Li X and Ye X. 2019. S-equol inhibits proliferation and promotes apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells via regulating miR-10a-5p and PI3K/AKT pathway. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **672**, 108064.

Zhao Q and Keating F. 2007. Expression and regulation of glucose transporters in the bovine mammary gland. *Journal of Dairy Science* **90**, E76-E86.

Zhao H, Sun J, Arao Y, Oguma E, Yamada K, Horiguchi H and Kayama F. 2006. Identification of equol producers in a Japanese population by high-performance liquid chromatography with coulometric array for determining serum isoflavones. *Phytomedicine* **13**, 304-309.

Zhao K, Liu Y, Zhou M and Liu X. 2010. Establishment and characterization of a lactating bovine mammary epithelial cell model for the study of milk synthesis. *Cell Biology International* **34**, 717-721.

Zheng Y, Qin H, Frank J, Deng L, Litchfield W, Tefferi A, Pardanani A, Lin T, Li J, Sha B and Benveniste N. 2011. A CK2-dependent mechanism for activation of the JAK-STAT signaling pathway. *Blood* **118**, 156-166.