



Title	乳腺上皮細胞における神経伝達物質受容体の生理的役割と作用機序の解明
Author(s)	韓, 靚
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第16772号
Issue Date	2026-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16772
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/99617
Type	doctoral thesis
File Information	HAN_Liang.pdf, 全文



乳腺上皮細胞における
神経伝達物質受容体の生理的役割と作用機序の解明

北海道大学 大学院農学院

生命フロンティアコース 博士課程

韓 靚

目次

第一章 緒論-----	1
第二章 乳腺上皮細胞におけるドーパミンシグナルの役割	
序文-----	5
結果-----	7
2.1 MEC はドーパミンを産生する	
2.2 MEC はドーパミン D2 受容体を発現する	
2.3 MEC における D2R の活性化	
2.4 D2R シグナルが MEC の生存性に及ぼす影響	
2.4.1 D2R の活性化と不活性化が細胞生存性に及ぼす影響	
2.4.2 D2R の活性化と不活性化が細胞増殖とアポトーシス誘導に及ぼす影響	
2.4.3 D2R の活性化が細胞生存性に関わるシグナル伝達経路に及ぼす影響	
2.5 D2R シグナルが MEC の乳産生能力に及ぼす影響	
2.5.1 D2R の活性化と不活性化が MEC の乳タンパク質産生に及ぼす影響	
2.5.2 D2R アゴニストとアゴニストの併用が MEC の乳タンパク質産生に及ぼす影響	
2.5.3 D2R シグナルが乳産生と炎症に関わる細胞内シグナル経路に及ぼす影響	
2.6 D2R シグナルが MEC の TJ に及ぼす影響	
考察-----	24
結論-----	27
第三章 乳腺上皮細胞における GABA シグナルの役割	
序文-----	28
結果-----	30
3.1 乳腺上皮細胞は GABA を産生する	
3.2 乳腺上皮細胞は GABA _A 受容体を発現する	
3.3 MEC における GABA _A 受容体の活性化	
3.4 GABA _A 受容体のアロステリック調節薬が MEC に及ぼす影響	
3.4.1 GABA _A 受容体のアロステリック調節薬が細胞生存性に及ぼす影響	

3.4.2 GABA _A 受容体のアロステリック調節薬がアポトーシスに及ぼす影響	
3.4.3 GABA _A 受容体のアロステリック調節薬が細胞生存性に関わるシグナル伝達経路に及ぼす影響	
3.4.4 GABA _A 受容体のアロステリック調節薬が MEC の乳タンパク質産生に及ぼす影響	
3.4.5 GABA _A 受容体のアロステリック調節薬が MEC の泌乳と炎症に関わるシグナル伝達経路に及ぼす影響	
3.4.6 GABA _A 受容体のアロステリック調節薬が MEC の TJ に及ぼす影響	
3.5 GABA _A 受容体を介した Cl ⁻ 流入阻害が MEC に及ぼす影響	
3.5.1 GABA _A 受容体を介した Cl ⁻ 流入阻害が MEC のアポトーシスと細胞生存に関わるシグナル伝達経路に及ぼす影響	
3.5.2 GABA _A 受容体を介した Cl ⁻ 流入阻害が MEC の乳タンパク質産生に及ぼす影響	
3.5.3 GABA _A 受容体を介した Cl ⁻ 流入阻害が MEC の泌乳と炎症に関わるシグナル伝達経路に及ぼす影響	
3.5.4 GABA _A 受容体を介した Cl ⁻ 流入阻害が MEC の TJ に及ぼす影響	
3.6 GABA の合成阻害が MEC の乳産生に及ぼす影響	
考察-----	59
結論-----	62

第四章 神経伝達物質シグナルの応用的解析

序文-----	63
結果-----	64
4.1 プロフラニリドが MEC に及ぼす影響	
4.1.1 プロフラニリドが MEC の細胞増殖性と生存性に及ぼす影響	
4.1.2 プロフラニリドが MEC の細胞生存性に関わるシグナル伝達経路に及ぼす影響	
4.1.3 プロフラニリドが MEC の乳タンパク質産生に及ぼす影響	
4.1.4 プロフラニリドが MEC の泌乳に関わるシグナル伝達経路に及ぼす影響	
4.1.5 プロフラニリドが MEC の炎症に関するシグナル伝達経路に及ぼす影響	

4.2 外因性 GABA が MEC の生存性と乳産生に及ぼす影響	
4.3 ドーパミン D2 受容体拮抗薬ドンペリドンが MEC による乳腺上皮組織発達に及ぼす影響	
4.3.1 ドンペリドンが培養下で乳腺オルガノイドの乳管伸長に及ぼす影響	
4.3.2 ドンペリドンが培養下で乳腺オルガノイドの乳腺胞出芽に及ぼす影響	
4.3.3 ドンペリドンが培養下で乳腺オルガノイドの乳腺胞内腔形成に及ぼす影響	
考察-----	80
結論-----	85
第五章 材料および方法-----	86
5.1 実験動物	
5.2 試薬類	
5.3 培地調製	
5.4 MEC の単離	
5.5 MEC の単層培養	
5.6 MEC の三次元培養	
5.7 ウェスタンブロッティング用のサンプル調製	
5.8 ウェスタンブロッティング	
5.9 免疫染色	
5.10 TUNEL 染色	
5.11 パラフィン切片の作製	
5.12 RNA 抽出と逆転写	
5.13 PCR	
5.14 乳タンパク質の定量 PCR	
5.15 細胞増殖性および細胞生存性の評価	
5.16 死細胞の測定	
5.17 経上皮電気抵抗値の測定	
5.18 cAMP 濃度の測定	
5.19 ドーパミン濃度測定	

5.20 GABA 濃度測定

5.21 塩素イオンのライブイメージング

5.22 統計解析

総括----- 99

要旨----- 103

謝辞----- 106

参考文献----- 107

第一章 緒論

神経伝達物質とは生体内で合成される低分子代謝産物であり、化学的メッセンジャーとしてニューロン間あるいはニューロンとエフェクター細胞間で情報を伝達する分子の総称である。現在までに約 100 種類の神経伝達物質が発見されており、その機能を大別すると、信号伝達を促進する「興奮性神経伝達物質」と抑制する「抑制性神経伝達物質」に分類される。興奮性神経伝達物質の中にはドーパミン、アセチルコリン、エピネフリン、ノルエピネフリン、ヒスタミンなどがあり、これらの神経伝達物質は標的細胞膜を脱分極させて神経興奮性を高める。一方、 γ -アミノ酪酸 (γ -Aminobutyric acid、GABA)、セロトニン、グリシンなどの抑制性神経伝達物質は、過分極を誘導して神経興奮を抑制する (Sheffler *et al.*, 2025)。これらの相反する神経伝達物質が中枢神経系と末梢神経系での情報伝達を制御している。しかし、近年の研究により興奮性と抑制性の神経伝達物質が非神経細胞からも放出されていることが明らかとなっている (表 1)。

表 1 非神経性の末梢組織の細胞から分泌される神経伝達物質

神経伝達物質	非神経性分泌	参考文献
ノルエピネフリン	胸腺細胞	(Roggero <i>et al.</i> , 2011; McBurney-Lin <i>et al.</i> , 2019)
セロトニン	消化管、がん細胞、免疫細胞	(Lifantseva <i>et al.</i> , 2017; Spohn and Mawe, 2017)
ドーパミン	消化管、胸腺細胞、免疫細胞	(Lifantseva <i>et al.</i> , 2016; Liu <i>et al.</i> , 2021)
γ -アミノ酪酸	がん細胞、膵島の内分泌細胞	(Soltani <i>et al.</i> , 2011; Kim <i>et al.</i> , 2015)
アセチルコリン	上皮細胞、免疫細胞、がん細胞	(Brenner <i>et al.</i> , 1978; Kawashima <i>et al.</i> , 2004)
ヒスタミン	肥満細胞	(Haas <i>et al.</i> , 2008; Misto <i>et al.</i> , 2019)
グルタミン酸	膵臓の内分泌細胞	(Cabrera <i>et al.</i> , 2008)

非神経細胞から放出される神経伝達物質は、血液を介したエンドクリン機構によって全身へ拡散することあれば、オートクラインやパラクライン機構を介して局所的に拡散する場合もある。例えば、最初に発見された神経伝達物質であるアセチルコリンは様々な非神経細

胞によって合成され、局所的な組織再生やがんの発達、全身性の免疫調節を制御していることが知られている (Reijmen *et al.*, 2018; Brenner *et al.*, 1978; Kawashima *et al.*, 2004)。また、免疫細胞はセロトニンなどの神経伝達物質を産生し、オートクラインおよびパラクライン経路を通じ周囲の微小環境をリモデリングする (Chen *et al.*, 2015; Briggs *et al.*, 2016)。このような学術的知見の積み重ねにより、神経伝達物質は古典的な神経シナプスの伝達物質としての枠を超え、多様な非神経系細胞の機能を制御する生理学的モジュレーターとして位置づけられるようになったのである。しかし、神経伝達物質が乳腺上皮細胞 (mammary epithelial cell、MEC)の機能に与える影響はいまだ十分に解明されていない。

MEC の主要な機能として、乳タンパク質、乳糖、脂質などの乳成分を合成・分泌することが挙げられる。MEC の乳成分産生は、分娩前後に増加する泌乳ホルモンである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 (Cerbulis and Farrell, 1975; Freeman *et al.*, 2000; Shyamala, 1973)。プロラクチンは MEC のプロラクチン受容体に結合すると、ヤヌスキナーゼ 2 (janus kinase 2、JAK2)の活性化を介してシグナル伝達兼転写活性化因子 5 (signal transducer and activator of transcription 5、STAT5)のリン酸化を誘導する。リン酸化された STAT5 は二量体を形成して核内へ移行し、転写調節因子として乳成分合成に関与する様々な遺伝子の転写を誘導する (Nilsson *et al.*, 2006; Tian *et al.*, 2020)。さらに、プロラクチンは MEC の Akt/mTOR シグナル伝達経路も活性化し、乳タンパク質合成を上方調節する (Liu *et al.*, 2015)。一方、グルココルチコイドはグルココルチコイド受容体 (glucocorticoid receptor、GR)と結合し、この複合体が核内へ移行して転写調節因子として機能する (Madan and DeFranco, 1993)。核内に移行したグルココルチコイド/GR 複合体は STAT5 と相互作用し、両シグナル経路が同時に活性化されることで、乳成分合成に関与する遺伝子の発現がさらに増強される (Bertucci *et al.*, 2010; Stöcklin *et al.*, 1996)。すなわち、泌乳期の MEC における乳成分産生能力はこれらのシグナル経路の活性化/不活性化によって調節されているのである。

泌乳期の MEC は、隣接する細胞との隙間にタイトジャンクション (tight junction、TJ)を形成する (Wellnitz and Bruckmaier, 2021)。TJ は細胞接着結合の一種であり、細胞間隙を透過す

るさまざまなイオンや高分子の単純拡散を抑制し、細胞間隙を介した乳成分と血液成分の漏出を防いでいる。また、TJは細胞の極性、運動性、増殖、および分化にも関与し、多角的に細胞の性状を調節している (Du *et al.*, 2010; Matter *et al.*, 2005; Shin *et al.*, 2006)。前述した GR 経路と STAT5 経路は、MEC における泌乳期特異的な TJ の形成を協調的に誘導することが知られている (Kobayashi *et al.*, 2016)。すなわち、プロラクチンとグルココルチコイドは MEC の乳産生と TJ 形成を同時に誘導しているのである。TJ の構成成分はクロードイン (claudin、CLDN) とオクルディン (occludin、OCLN) である。CLDN には 27 種類のサブタイプがあり、そのサブタイプの組成により TJ バリアの強さや物質透過性が決定される (Günzel and Yu, 2013)。泌乳期特異的な TJ には特に CLDN 3 が多く、泌乳期の強固なバリア機能と密接に関わることが報告されている (Kobayashi *et al.*, 2013)。しかし、TJ のバリア機能は退縮期の乳腺や乳房炎に発症した乳腺で損なわれ、その結果として乳中には過度の血液成分や免疫細胞が漏出し、乳汁の質的低下が引き起こされるようになる (Wellnitz and Bruckmaier, 2021)。そのような場合、TJ を構成する CLDN3 の局在は変化し、一方で CLDN4 が増加する。したがって、TJ の構造や機能、その CLDN 組成は MEC の乳産生と密接に関わっていると考えられる。

神経細胞や非神経細胞には特定の神経伝達物質を受け取るための受容体が多種多様に発現している。これらの受容体を大別すると、イオン型受容体 (ionotropic receptors) と代謝型受容体 (metabotropic receptors) に分けられる。イオン型受容体はリガンド依存性イオンチャネルとして機能し、 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 、 Ca^{2+} などのイオンを細胞内外に輸送し、瞬時に膜電位を変動させることで迅速な細胞応答を誘発する (Hodgkin and Huxley, 1952)。一方、代謝型受容体は G タンパク質共役受容体 (G protein-coupled receptor、GPCR) ファミリーに属し、神経伝達物質の結合を契機として異なる G タンパク質を活性化し、細胞内でセカンドメッセンジャーを介したシグナルカスケードを引き起こす (Gilman, 1987)。代謝型受容体下流のシグナル伝達は比較的緩やかであり、持続性をもつ反応や複雑な調節を可能にする。非神経細胞においては、イオン型受容体も代謝型受容体も発現し、その機能的調節に関わっていることが報告さ

れている。たとえば、膵臓 β 細胞では GABA_A 受容体が Cl⁻ の流入を仲介し、インスリン分泌に影響を与える (Untereiner *et al.*, 2019)。また、インスリン分泌は代謝型グルタミン酸受容体 (metabotropic glutamate receptor、mGluR) によっても制御されている (Ulyanova *et al.*, 2005)。血管内皮細胞に発現するニコチン性アセチルコリン受容体 (nicotinic acetylcholine receptor、nAChR) は一酸化窒素依存的な血管拡張反応に関与し (Kelkar *et al.*, 2013)、免疫細胞に発現する GABA-B 受容体は NF κ B の活性化を抑えることで炎症シグナルを制御する (Li *et al.*, 2017)。さらに、nAChR、mGluR、アドレナリン受容体、ドーパミン受容体、およびセロトニン受容体は乳腺組織や乳がん細胞にも発現している (Kobayashi *et al.*, 2025; Teh *et al.*, 2015; Gargiulo *et al.*, 2017; Farmer and Palin, 2021; Stull *et al.*, 2007)。現在までに、セロトニン受容体と nAChR が乳腺上皮細胞の乳分泌に関与することは既に報告されている (Kobayashi *et al.*, 2025)。しかし、他の神経伝達物質の受容体が乳腺上皮細胞に発現し、その乳分泌を調節しているか、依然として明らかにされていない。

従来、GABA やドーパミンなどの神経伝達物質は主に中枢神経系で機能すると考えられてきた。しかし、神経伝達物質は神経系のみならず、非神経性組織でも多様な生理機能を制御することが近年の研究により明らかになりつつある。しかし、MEC の生存性や機能性に対する直接的な作用の存在その作用機構については十分に解明されていない。本研究では、授乳期における興奮性と抑制性の神経伝達物質が MEC の機能に及ぼす影響とその分子機構を明らかにすることを目的として、マウス MEC の乳成分産生と TJ 形成を培養下で再現した *in vitro* 泌乳モデルを用いて、代表的な興奮性神経伝達物質受容体「ドーパミン」および抑制性神経伝達物質受容体「GABA」が乳成分合成、TJ 形成、細胞増殖、ならびに関連シグナル伝達経路に及ぼす影響を体系的に調べた。さらに、ドーパミン受容体や GABA 受容体受容体を標的とする外因性化学物質 (殺虫剤・飼料添加物・薬物) が、MEC の機能および泌乳能力に与える潜在的な影響についても検討した。

第二章 乳腺上皮細胞におけるドーパミンシグナルの役割

序文

ドーパミンは中枢神経系で運動制御や内分泌調節を担う代表的な興奮性の神経伝達物質であり、ドーパミンが下垂体前葉のプロラクチン分泌を抑制することによって乳腺組織での乳産生も抑制されることが知られている (Fitzgerald and Dinan, 2008; Romanò *et al.*, 2013)。しかし、近年の研究により、ドーパミンは中枢以外の末梢組織にも広く含有し、免疫系、心血管系、腎臓、膵臓、消化管、さらには卵巣など、多様な組織で産生されていることが明らかにされている (Bucolo *et al.*, 2019; Borcharding *et al.*, 2011; Neumann *et al.*, 2023; Choi *et al.*, 2015; Aslanoglou *et al.*, 2021)。これらの末梢組織にはドーパミン受容体を発現する細胞も多く存在し、ドーパミンを受容することによってホルモン分泌、細胞増殖、代謝調節などの生理機能を精密に制御していることが報告されている (Pivonello *et al.*, 2007; Leebaw *et al.*, 1978; Tsao *et al.*, 1997; Rubí and Maechler, 2010)。すなわち、ドーパミンは、従来の神経伝達物質としての役割を超えて、非神経系の末梢組織においても細胞の性状を調節するパラクライン因子として機能しているのである。

ドーパミンは L-チロシンを材料として、チロシン水酸化酵素と芳香族 L-アミノ酸脱炭酸酵素による代謝変換を経て合成される。また、ドーパミン受容体は GPCR であり、興奮性の D1 様受容体 (D1R, D5R) と抑制性の D2 様受容体 (D2R, D3R, D4R) の 2 種類のサブタイプに大別される (Bhatia *et al.*, 2025)。興奮性の D1 様受容体がアデニル酸シクラーゼを活性化して細胞内 cAMP 濃度を上昇させる一方、抑制性の D2 様受容体は $G_{i/o}$ タンパク質を介してアデニル酸シクラーゼ活性を抑制し、cAMP 産生を減少させるという拮抗的作用を示す (Bhatia *et al.*, 2025; Beaulieu and Gainetdinov, 2011)。これら 5 種類のドーパミン受容体は組織や細胞種によって発現パターンが異なっており、中枢神経、末梢神経、および非神経の末梢組織の生理機能をそれぞれ担っている。例えば、腎臓上皮細胞に発現する D1R が活性化するとナトリウムの排泄が促進され、血圧恒常性の維持に寄与していることが知られている (Olivares-

Hernández *et al.*, 2021; Jose *et al.*, 2010)。また、膵島 β 細胞には D1R、D2R、D3R が発現し、ドーパミン D2R 作動薬、D3R 拮抗薬、D4R 拮抗薬がインスリン分泌を抑制、D2R 拮抗薬と D3R 作動薬がインスリン分泌を増加させることが報告されている (Uefune *et al.*, 2022; Vázquez-Carrillo *et al.*, 2024; Ferrero *et al.*, 2024; Zhang *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2020)。過剰発現した D2R が NF κ B シグナル伝達経路を阻害することで肺がんの発生を抑制すること (Wu *et al.*, 2018)、ドーパミン D4R とその下流の MAPK/ERK 経路の活性化が表皮細胞株のデングウイルス感染に関与すること (Smith *et al.*, 2014)、ドーパミン D5R の欠損が脂肪細胞の褐色化と筋細胞における ATP 消費を抑制することなども報告されている (Haddish and Yun, 2024)。さらに、生殖器官では D2 様受容体がステロイドホルモン産生や細胞増殖を調節し、組織の成熟や機能分化に関与している (Levavi-Sivan *et al.*, 2006)。しかし、乳腺組織におけるドーパミン受容体の発現パターンや役割は現時点でほとんどわかっていない。

MEC は、分娩前後に上昇するプロラクチンおよびグルココルチコイドの作用を受けて細胞内の STAT5 経路と GR 経路を活性化させ、乳タンパク質 (α -, β -カゼインなど)の産生能力を上昇させ、強固な TJ を形成することが知られている (Kobayashi *et al.*, 2017)。STAT5 経路と GR 経路の活性化にはセカンドメッセンジャーである cAMP も関わっており、適切な cAMP 濃度が乳腺形成、MEC の増殖と分化、乳タンパク質遺伝子の発現に不可欠であることも報告されている (Pace *et al.*, 2011; Dong *et al.*, 1989)。前述したように、D1 様受容体はアデニル酸シクラーゼを活性化して細胞内 cAMP 濃度を上昇させ、D2 様受容体はアデニル酸シクラーゼ活性を抑制して cAMP 産生を減少させる。したがって、乳腺組織の MEC におけるドーパミン受容体の活性化は細胞内の cAMP 濃度を変化させ、cAMP 濃度変化を介して MEC の増殖、分化、乳産生などが調節されている可能性がある。

これまでの研究では、ドーパミンが下垂体細胞のプロラクチン分泌を抑制することは知られていたが、末梢の乳腺組織で直接的に細胞機能を制御する可能性については十分に検証されていなかった。本研究では、MEC が D2R を介してドーパミンを感受しうる細胞であることを世界初で実証し、その活性化によって引き起こされる cAMP 応答および下流シグナル経

路の変化を解析した。さらに、D2R シグナルが乳タンパク質合成、細胞生存、TJ 形成に与える影響を包括的に検証し、乳腺における局所的なドーパミンシグナルの自律的調節機構の存在を明らかにすることを目的とした。

結果

2.1 MEC はドーパミンを産生する

ドーパミンはチロシンを材料としてチロシン水酸化酵素 (tyrosine hydroxylase、TH)と芳香族 L-アミノ酸脱炭酸酵素 (DOPA decarboxylase、DDC)を介して合成される (Daubner *et al.*, 2011) (図 2-1A)。本研究では、MEC のドーパミン産生能力を検証するため、マウス乳腺組織および培養 MEC におけるこれら合成酵素の発現を調べた。RT-PCR 解析の結果、TH および DDC の mRNA はポジティブコントロールのマウス脳、乳腺組織、および培養 MEC において検出された (図 2-1B)。続いて、MEC が実際にドーパミンを産生・分泌するかを明らかにするため、脳、乳腺の抽出液とともに、乳分泌誘導培地で 72 時間培養した MEC の細胞内画分および培地上清中のドーパミン濃度を測定した。その結果、脳抽出液では 1000 ppm を超える濃度のドーパミンが確認された。また、乳腺抽出液からも 200 ppm のドーパミンが検出された。しかし、MEC の細胞内画分および培地上清ではドーパミンは測定限界値 (50 ppm)を下回っており、少なくとも培養下でドーパミンの合成は認められなかった (図 2-1C)。これらの結果から、乳分泌培養モデルの MEC はドーパミン合成酵素を発現しているものの、そのドーパミン合成量は極めて低いことがわかった。

2.2 MEC はドーパミン D2R を発現する

バージンマウス由来の脳組織と乳腺組織、および乳分泌培養モデルの MEC におけるドーパミン受容体の発現を RT-PCR で調べた。脳組織ではドーパミン受容体サブタイプの D1r、D2r、D3r、D4r が検出されたが、バージンマウス由来の乳腺組織ではいずれのサブタイプも検出されなかった (図 2-2A)。一方、乳産生能力を誘導した培養下の MEC では D2r が発現し

ていた。続いて、乳分泌培養モデルの MEC における D2R の局在を免疫染色で調べた。D2R は細胞質と細胞膜に局在し、細胞膜の D2R は TJ マーカーである OCLN と共局在していた (図 2-2B)。Z 軸スキャンにより、MEC の垂直断面を画像化すると、OCLN と D2R が側部細胞膜の頭上部近傍に共局在していることが確認された。

続いて、妊娠前期と妊娠後期のマウス乳腺における D2R の局在を免疫染色で調べた。妊娠前期と妊娠後期の乳腺では、上皮組織を構成する一部の MEC で D2R の陽性反応が周囲よりもやや強く観察された (図 2-2C)。なお、血管内には赤血球による自家蛍光が観察された。

2.3 MEC における D2R の活性化

GPCR である D2R は G_i タンパク質と共役してアデニル酸シクラーゼ活性を抑制し、cAMP 産生を減少させることが知られている (Obadiah *et al.*, 1999)。そこで MEC における D2R の活性化を調べるため、D2R アゴニストであるブロモクリプチンまたはアンタゴニストであるドンペリドンで 24 時間処理し、cAMP 濃度を ELISA 法により測定した (図 2-3A)。その結果、ブロモクリプチン処理群では細胞内 cAMP 濃度が対照群の約 43% に低下し、ドンペリドン処理群では逆に対照群の約 1.7 倍に上昇していた。さらに、ブロモクリプチンとドンペリドンを同時処理した群では、ブロモクリプチンによる cAMP 低下作用は完全に打ち消された。これらの結果から、MEC に発現する D2R は G_i 経路を介して cAMP 産生を負に制御し、機能的な受容体として機能していることがわかった。

続いて、ブロモクリプチンによる短時間刺激が cAMP 下流のシグナル分子である Akt と ERK の活性化に及ぼす影響を調べた。MEC をブロモクリプチンで 0.5、1、3 時間処理し、活性化体である p-Akt と p-ERK の発現を調べた結果、p-Akt および p-ERK は処理 0.5 時間後に一過性に上昇し、1 時間以降に減少した (図 2-3B, C)。まだ、非活性体の Akt は変化なかったが、ERK は処理 0.5 時間後に一過性に上昇し、1 時間以降に減少した (図 2-3B, C)。

以上の結果から、MEC の D2R は細胞内 cAMP レベルを調節し、cAMP 下流のシグナル分子である Akt と ERK の活性化レベルを迅速に変化させることが示唆された。

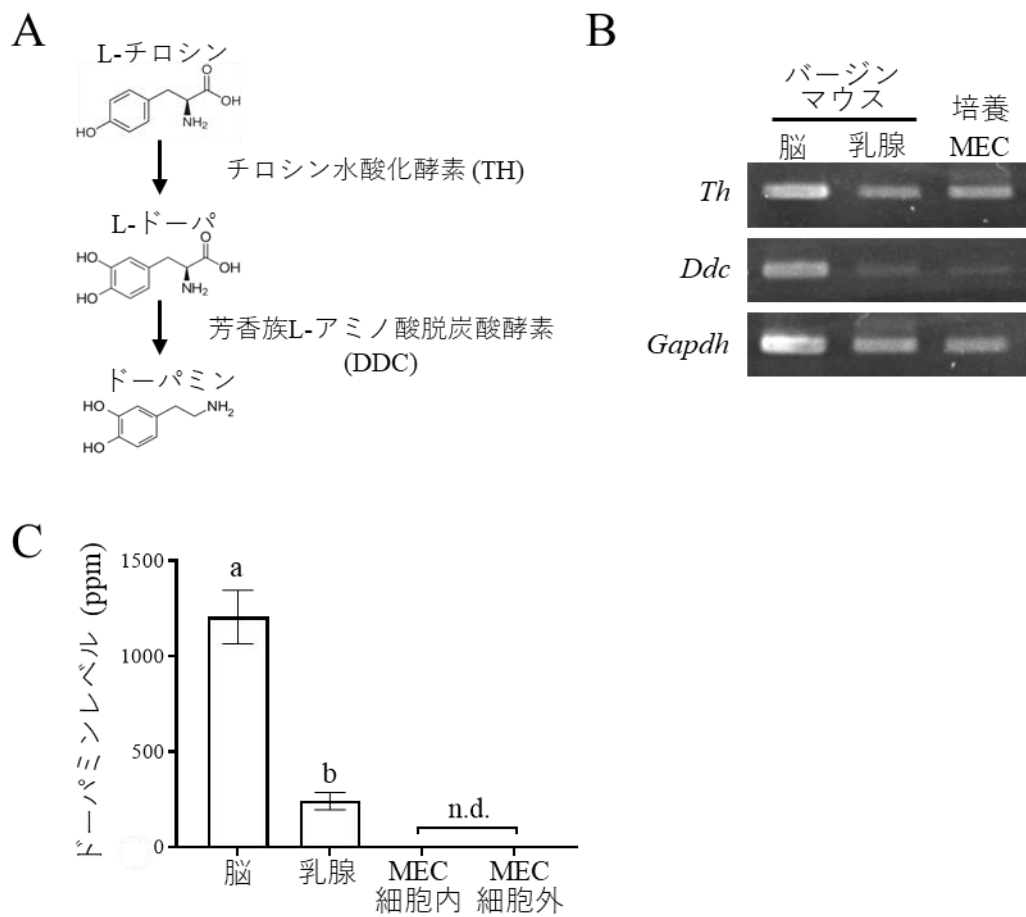


図 2-1 乳腺と培養下の MEC におけるドーパミンの産生

(A) L-チロシンからドーパミンを合成する経路と酵素を示す。(B) バンドはバージンマウスの脳と乳腺、および培養モデルの MEC におけるドーパミン合成酵素 (*Th*, *Ddc*) と *Gapdh* の mRNA 発現を RT-PCR で検出したアガロース電気泳動像を示す。(C) 脳、乳腺、および培養モデル MEC の細胞内と細胞外におけるドーパミン濃度を比較した。Not Detected (n.d.) は不検出を表す。エラーバーは標誤差を示す (n = 3)。

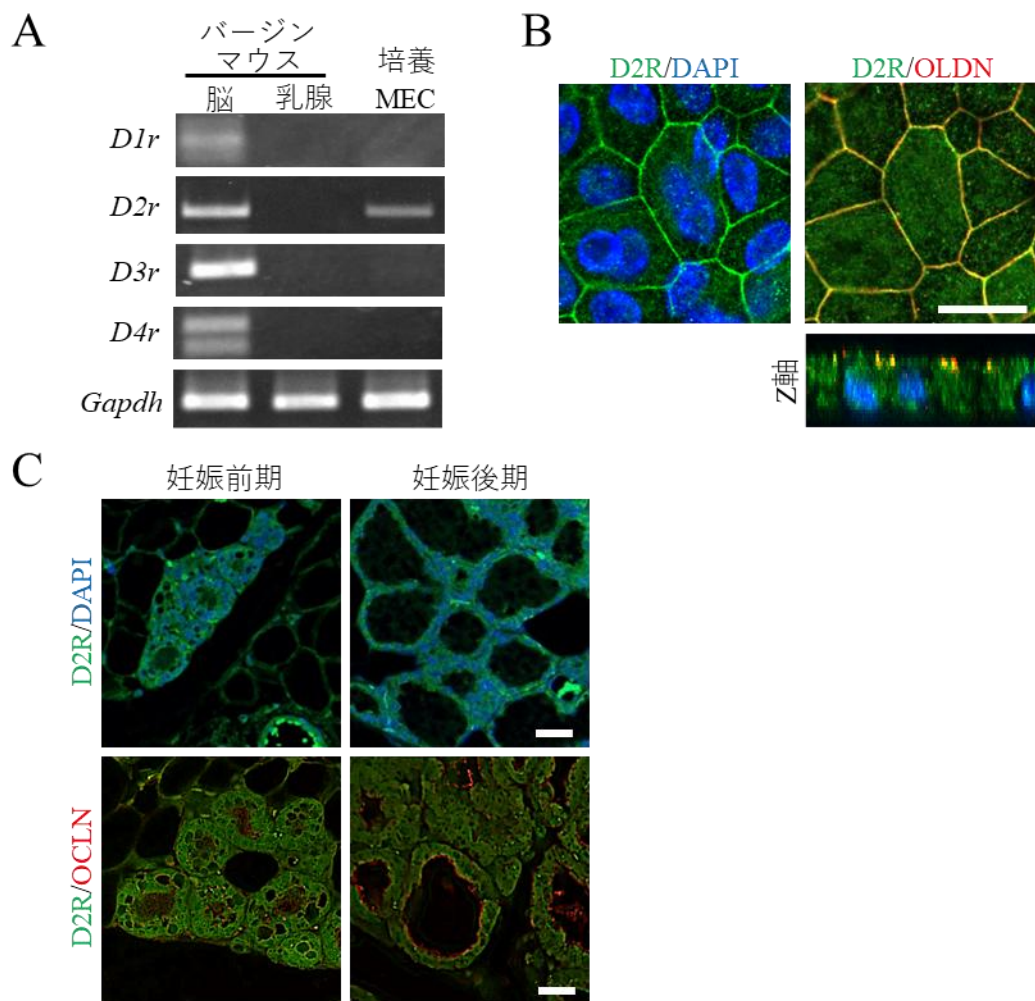


図 2-2 乳腺と培養下の MEC におけるドーパミン受容体の発現

(A) バンドはバージンマウスの脳と乳腺、および培養モデルの MEC におけるドーパミン受容体サブタイプ (*D1r*, *D2r*, *D3r*, *D4r*)と *Gapdh* の mRNA 発現を RT-PCR で検出したアガロース電気泳動像を示す。(B, C) 培養モデルの MEC (B)と妊娠前期または妊娠後期の乳腺 (C)における D2R (緑)の代表的な免疫染色像を示す。なお、赤は OCLN、青は DAPI で染色された核、スケールバーは 10 μm (B)、50 μm (C)を示す。

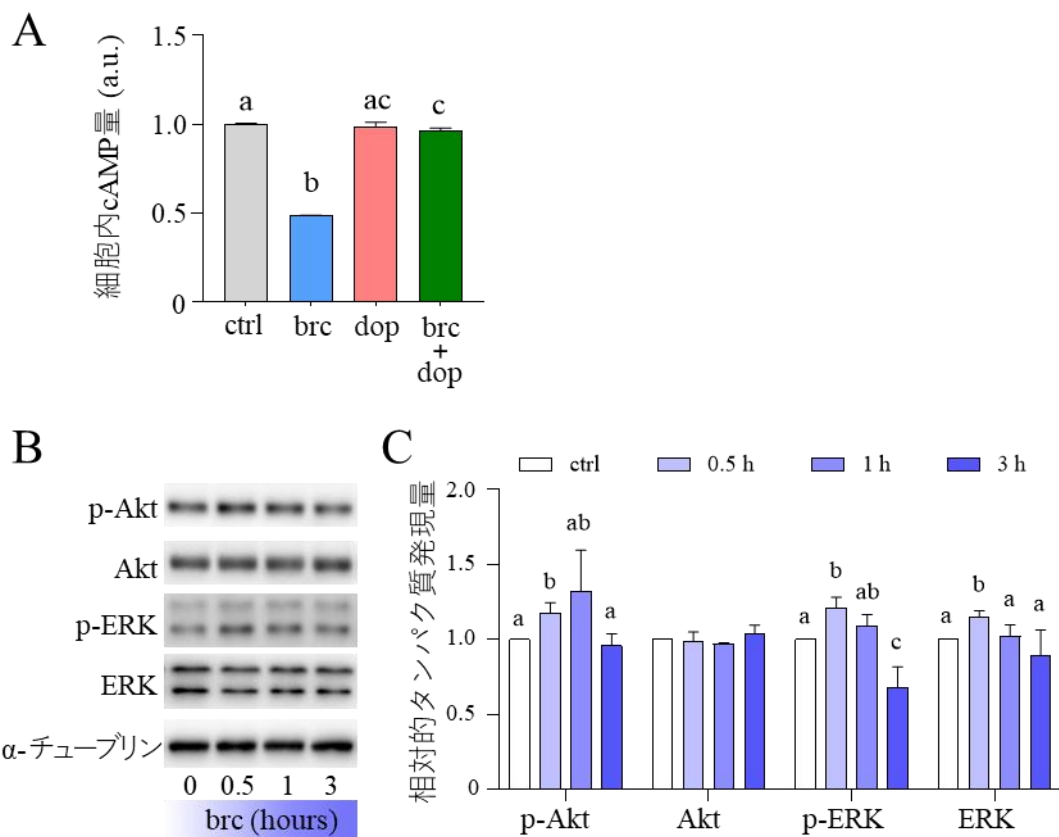


図 2-3 D2R アゴニストによる MEC の D2R 活性化

(A) ブロモクリプチン 1.2 μ M、ドンペリドン 1.2 μ M、あるいは両方を含む分化培地で 24 時間培養した MEC における細胞内 cAMP 量の相対値を示す。エラーバーは標準誤差、異符号間は $p < 0.05$ を示す ($n = 4$)。 (B, C) ブロモクリプチン 1.2 μ M を含む分化培地で 0.5、1、3 時間培養した MEC におけるリン酸化 Akt (p-Akt)、Akt、p-ERK、ERK、 α -チューブリンの代表的なウェスタンブロッティング像 (B)、およびバンドをデンスitrometry 解析して α -チューブリンで標準化したタンパク質量のグラフを示す (C)。エラーバーは標準誤差、異符号間は $p < 0.05$ を示す ($n = 4$)。

2.4 D2R シグナルが MEC の生存性に及ぼす影響

2.4.1 D2R の活性化と不活性化が細胞生存性に及ぼす影響

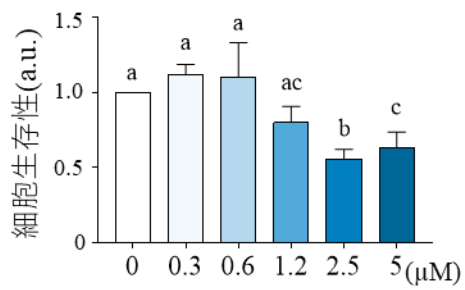
Akt/mTOR および ERK シグナル経路が MEC の生存性と増殖性を調節することが報告されている (McCubrey *et al.*, 2007; Pauloin and Chanat, 2012)。そこで、D2R アゴニストであるブロモクリプチンおよびアンタゴニストであるドンペリドンが MEC の細胞生存性に及ぼす影響を調べた。ブロモクリプチンを 0.3–5 μM の濃度範囲で 48 時間処理し、WST-8 アッセイによる解析の結果、ブロモクリプチン 2.5 μM および 5 μM 処理群では細胞生存性が有意に低下した (図 2-4 A)。一方、ドンペリドンを 0.4–50 μM で 48 時間処理した場合、10 μM 以下では細胞形態および生存性に有意な変化はみられなかったが、50 μM で細胞生存性が有意に低下した (図 2-4 B)。

以上の結果に基づき、以降の培養実験では細胞生存性が有意に低下しないブロモクリプチン 1.2 μM 、ドンペリドン 10 μM の処理を行った。

2.4.2 D2R の活性化と不活性化が細胞増殖とアポトーシス誘導に及ぼす影響

D2R シグナルの活性化は癌細胞のホルモン非依存的に細胞増殖を抑制し、アポトーシスを誘導することが報告されている (Palmeri *et al.*, 2009; Rowther *et al.*, 2010)。泌乳期の正常な MEC においても D2R シグナルの活性化が細胞増殖抑制とアポトーシス誘導をするのかを確認するため、ブロモクリプチンで 72 時間処理した MEC を用いて、増殖マーカーである Ki67 とアポトーシスマーカーである cleaved caspase-3 の免疫染色を行った。コントロール群および処理群の両方で、Ki67 と cleaved caspase-3 に対する陽性反応が一部の MEC で観察された (図 2-5A, B)。Ki67 陽性細胞率と一定面積の細胞層における cleaved caspase-3 陽性細胞数をそれぞれ画像解析により測定すると、Ki67 陽性細胞率はブロモクリプチン存在下で減少し (図 2-5C)、cleaved caspase-3 陽性細胞数はコントロール群よりもブロモクリプチン処理群で有意に多かった (図 2-5C D)。一方、ドンペリドン処理群では cleaved caspase-3 に対する陽性反応はコントロール群と同レベルであった有意差がなかった。

A



B

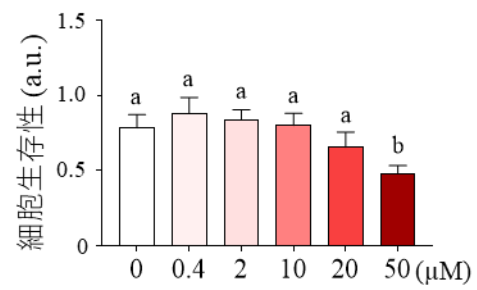


図 2-4 D2R アゴニストとアンタゴニストの細胞毒性試験

(A) 0.3–5 μM のブロモクリプチンあるいは (B) 0.4–50 μM のドンペリドンを含む増殖培地で 48 時間培養した MEC の細胞生存性の相対値を示す。エラーバーは標準誤差、異符号間は $p < 0.05$ を示す ($n = 5$)。

2.4.3 D2R の活性化が細胞生存性に関わるシグナル伝達経路に及ぼす影響

前述の 2.4.1 において MEC にブロモクリプチンを短時間処理した場合、細胞生存性に関わる Akt/mTOR および ERK シグナル経路に一過性に影響することを示した。しかし、細胞死を誘導する中長期の処理が Akt/mTOR および ERK シグナル経路に及ぼす影響は不明である。そこで、ブロモクリプチンの 8、24、および 72 時間処理が MEC における p-Akt、Akt、p-mTOR、mTOR、p-ERK、ERK の発現量に及ぼす影響を調べた。Akt および mTOR のリン酸化レベルおよび発現量は、コントロールと比較して顕著な差がみられなかった (図 2-6A, B)。ERK のリン酸化レベルは、ブロモクリプチン処理の 24 および 72 時間後に減少し、一方で ERK の発現レベルはほとんど変化しなかった (図 2-6A, C)。続いて、アポトーシス誘導に関わるタンパク質である BAX と抗アポトーシスタンパク質である Bcl2 の発現レベルを調べると (Knudson and Korsmeyer, 1997)、ブロモクリプチン処理 72 時間後において BAX および Bcl2 の発現はともに増加していた (図 2-6A, C)。

2.5 D2R シグナルが MEC の乳産生能力に及ぼす影響

2.5.1 D2R の活性化と不活性化が MEC の乳タンパク質産生に及ぼす影響

D2R シグナルが乳タンパク質の産生に及ぼす影響を調べるため、MEC を 10 μ M のドンペリドンあるいは 1.2 μ M のブロモクリプチンで 8、24、および 72 時間処理し、細胞内および培地へ分泌された乳タンパク質 (α -、 β -カゼイン、およびラクトフェリン)をウェスタンブロットとそのバンドのデンストメトリー解析で調べた。その結果、ドンペリドン処理群の MEC では細胞内および分泌された乳タンパク質量はコントロール群と同レベルであったが(図 2-7A, B)、ブロモクリプチン処理群では細胞内および分泌された α -、 β -カゼイン、およびラクトフェリンの量がブロモクリプチンの処理時間に応じた減少していた (図 2-7C, D)。

2.5.2 D2R アゴニストとアゴニストの併用が MEC の乳タンパク質産生に及ぼす影響

D2R アンタゴニストであるドンペリドンがアゴニストであるブロモクリプチンの作用を中和するかを検証するため、MEC を 10 μ M ドンペリドン、1.2 μ M ブロモクリプチンの存在下・

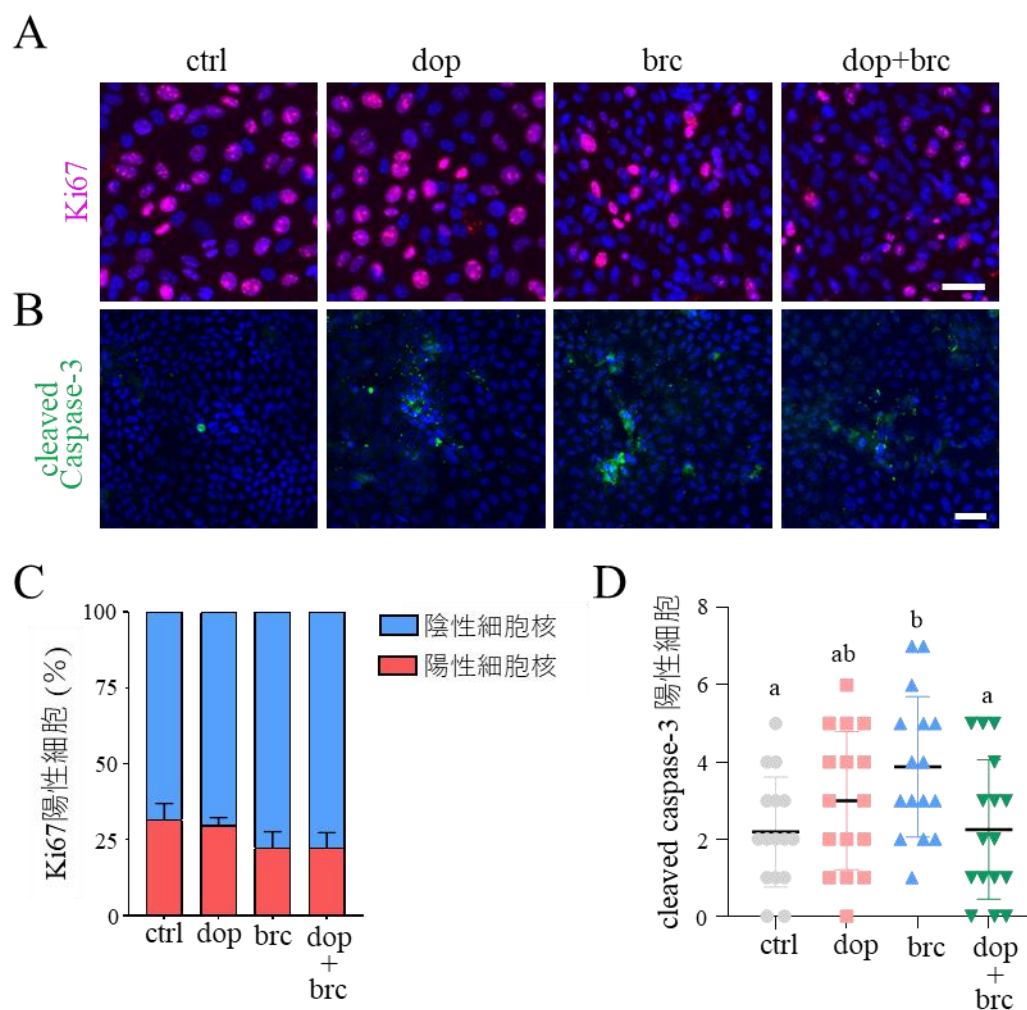


図 2-5 D2R アゴニストとアンタゴニストの併用が MEC の増殖性とアポトーシスに及ぼす影響

(A, B) ドンペリドン (dop) 10 μ M、プロモクリプチン (brc) 1.2 μ M、あるいは両方を含む分化培地で 24 時間培養した MEC における Ki67 (赤; A)と cleaved caspase-3 (緑; B)の代表的な免疫染色像を示す。図中の矢印は陽性細胞、スケールバーは 20 μ m を示す。(C) グラフは Ki67 の免疫染色像でカウントされた Ki67 陽性細胞と DAPI 陽性細胞の割合を示す。エラーバーは標準誤差を示す (n = 30)。(D) グラフは cleaved caspase-3 の免疫染色像でカウントされた陽性細胞数を示す。エラーバーは標準誤差、異符号間には $p < 0.05$ を示す (n = 16)。

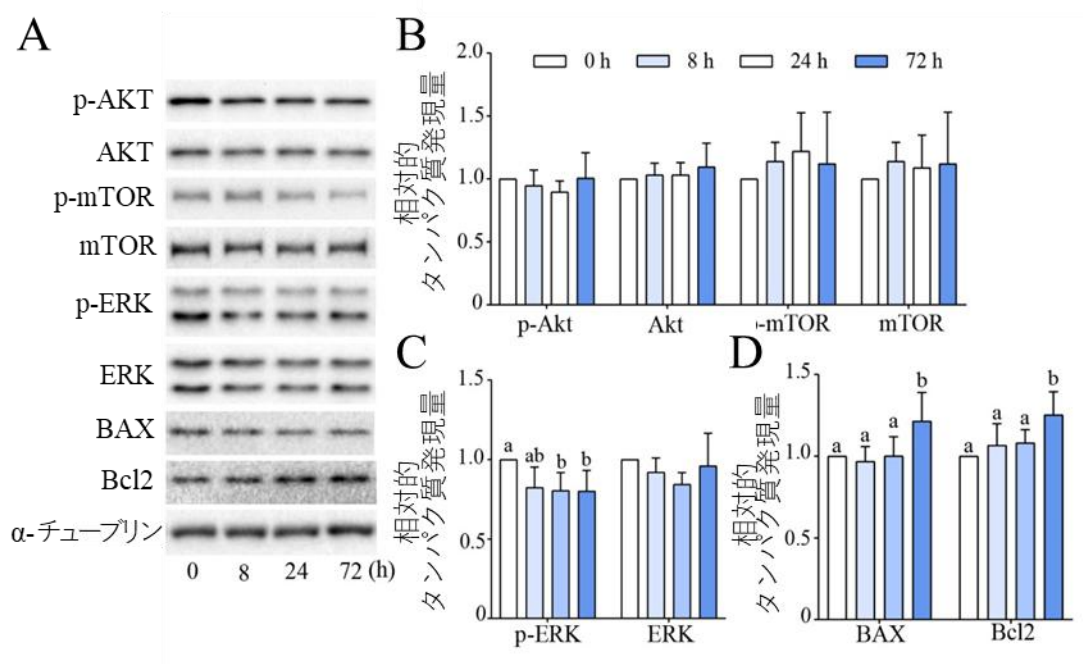


図 2-6 D2R アゴニストが MEC の細胞生存率に関するシグナル伝達経路に及ぼす影響

(A–C) プロモクリプチン 1.2 μ M を含む分化培地で 8、24、72 時間培養した MEC におけるリン酸化 Akt (p-Akt)、Akt、p-mTOR、mTOR、p-ERK、ERK、BAX、Bcl2、 α -チューブリンの代表的なウェスタンブロットティング像(A)、およびバンドをデンシトメトリー解析して α -チューブリンで標準化したタンパク質量のグラフを示す (B–D)。エラーバーは標準誤差、異符号間は $p < 0.05$ を示す ($n = 10$)。

非存在下で 24 時間処理し、細胞内および培地における乳タンパク質 (α -、 β -カゼイン、およびラクトフェリン)発現を mRNA およびタンパク質レベルで調べた。定量 PCR の結果、ブロモクリプチンが α -、 β -カゼイン、およびラクトフェリンの mRNA を減少させること、ドンペリドンの併用がブロモクリプチンによる α -、 β -カゼインの mRNA 量減少を軽減することがわかった (図 2-8A)。しかし、ラクトフェリンの mRNA 量においては、ドンペリドン存在下でもブロモクリプチンの影響は軽減しなかった。続いて、ウェスタンブロットとデンストメトリ解析でタンパク質レベルでの中和作用を調べた。ドンペリドンのみで処理した場合、図 2-9 の結果と同じく MEC の乳タンパク質産生に影響は認められなかった (図 2-8B, C)。ブロモクリプチンのみ処理した場合も図 2-7 と同様に、細胞内および培地に分泌された α -および β -カゼイン量が減少し、細胞内ラクトフェリン量も 8 割程度に減少した (図 2-8B, C)。一方、ドンペリドンとブロモクリプチンを同時処理した群では、細胞内および培地に分泌された α -および培地中の β -カゼインの発現量がブロモクリプチン処理群よりも有意に増加し、細胞内 β -カゼイン量はコントロール群の 7 割程度、他はコントロール群と同レベルの値を示した。

β -カゼインは乳タンパク質の主成分であり、ゴルジ体で翻訳後修飾を受けてカゼインミセルを形成することが報告されている (Chanat *et al.*, 1999)。そこで、 β -カゼインの細胞内局在をゴルジ体マーカーの GM130 とともに免疫染色により観察した。コントロール群と 10 μ M ドンペリドン 24 時間処理群では、 β -カゼインの強染部位は GM130 の陽性部位と一致していた (図 2-9)。一方、1.2 μ M ブロモクリプチンで 24 時間処理した MEC では、コントロールと比較して、ゴルジ体での β -カゼインに対して弱い陽性反応を示した。また、GM130 の免疫染色像を拡大すると、ブロモクリプチンで処理した MEC ではゴルジ体が縮小している様子も観察された。一方、ドンペリドンとブロモクリプチンの併用処理群では、ブロモクリプチンによる β -カゼイン局在とゴルジ体の形態への影響が部分的に回復していた。

2.5.3 D2R シグナルが乳産生と炎症に関わる細胞内シグナル経路に及ぼす影響

プロラクチンとグルココルチコイドはそれぞれ STAT5 経路と GR 経路を活性化し、泌乳期の

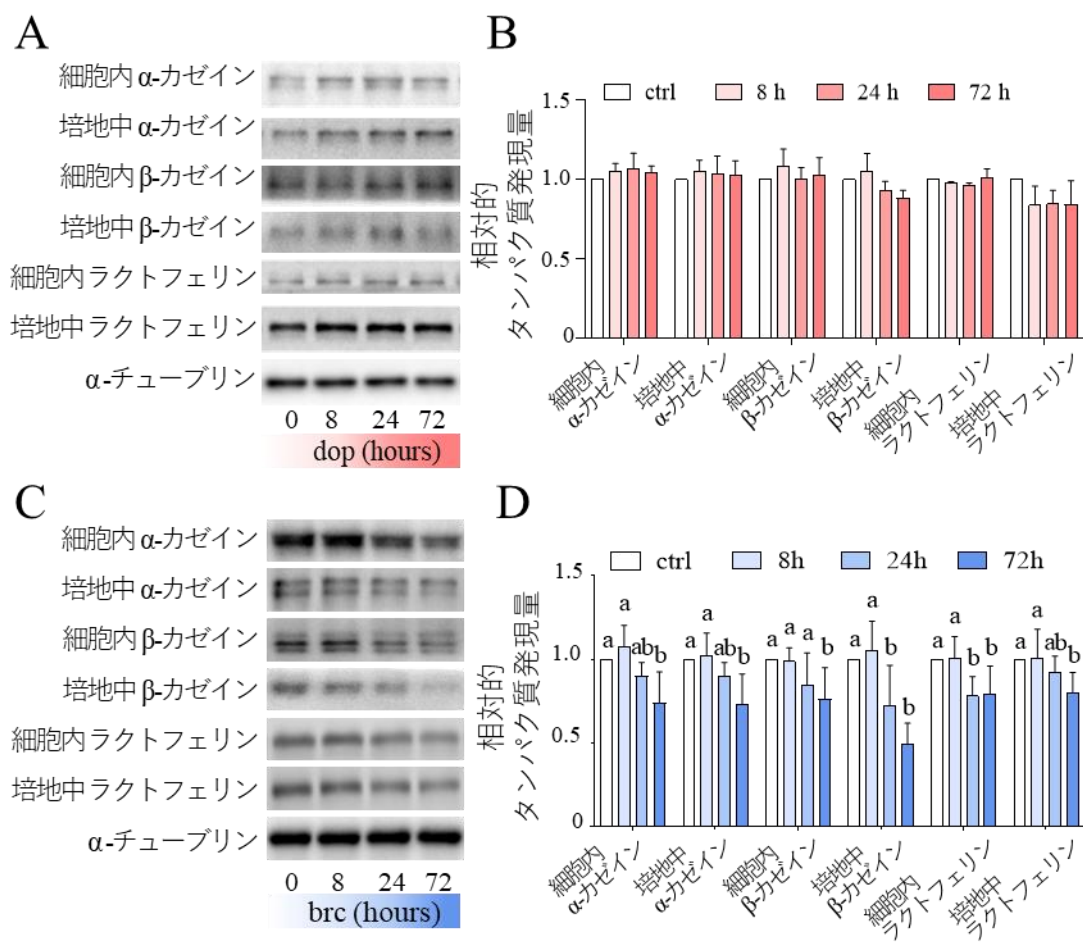


図 2-7 D2R アゴニストとアンタゴニストが MEC の乳タンパク質産生に及ぼす影響

(A–D) ドンペリドン (dop) 10 μ M、あるいはブロモクリプチン (brc) 1.2 μ M を含む分化培地で 8、24、72 時間培養した MEC における細胞内および培地中に分泌された α -カゼイン、 β -カゼイン、ラクトフェリン、 α -チューブリンの代表的なウェスタンブロッティング像 (A, C)、およびバンドをデンストメトリー解析して α -チューブリンで標準化したタンパク質量のグラフを示す (B, D)。エラーバーは標準誤差、異符号間には $p < 0.05$ を示す ($n = 10$)。

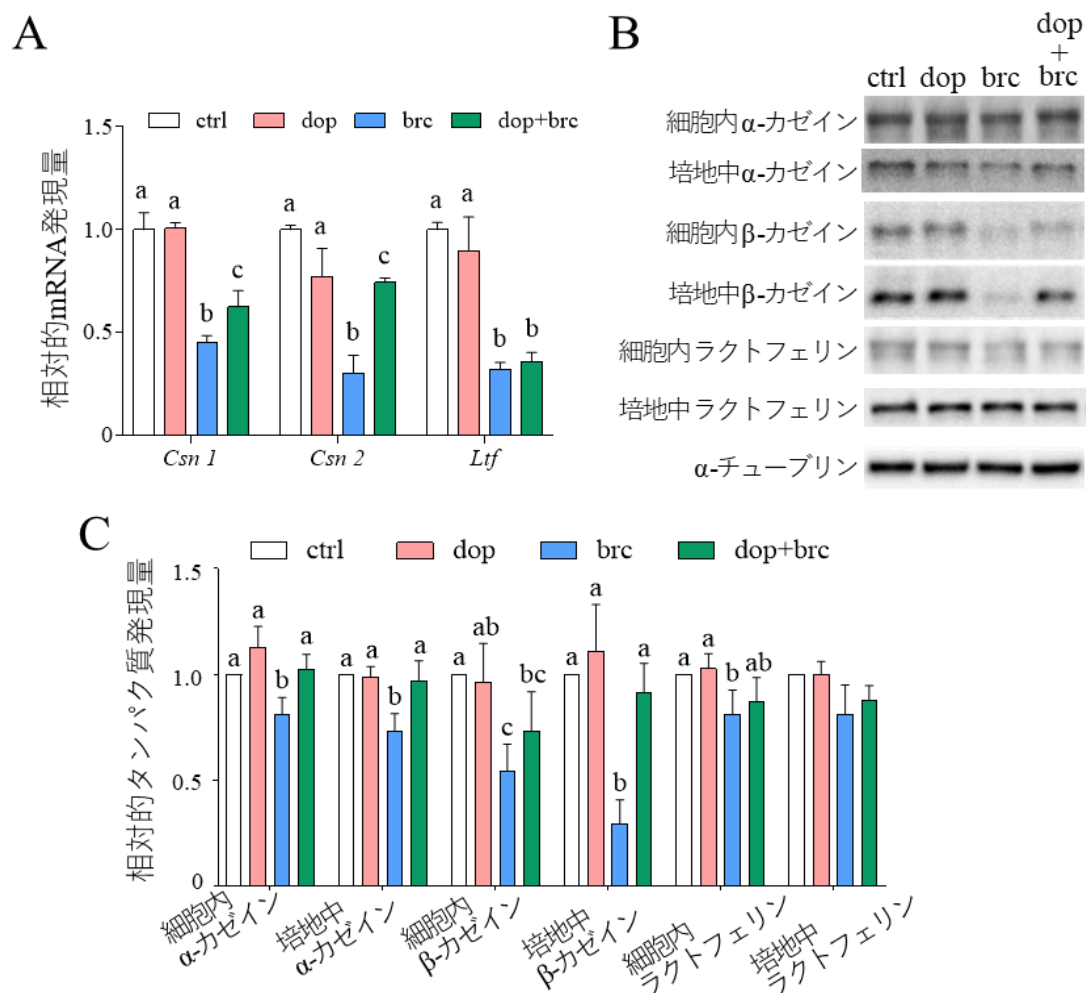


図 2-8 D2R アゴニストとアンタゴニストの併用が MEC の乳タンパク質産生に及ぼす影響

(A) ドンペリドン (dop) 10 μ M、プロモクリプチン (brc) 1.2 μ M、あるいは両方を含む分化培地で 24 時間培養した MEC における細胞内 *Csn1*、*Csn2*、*Ltf* の mRNA 発現量を示す。エラーバーは標準誤差、異符号間は $p < 0.05$ を示す (n=4)。(A、B) 細胞内および分泌された α -カゼイン、 β -カゼイン、ラクトフェリン、 α -チューブリンの代表的なウェスタンブロットティング像 (B)、およびバンドをデンストメトリ解析して α -チューブリンで標準化したタンパク質量のグラフを示す (C)。エラーバーは標準誤差、異符号間は $p < 0.05$ を示す (n=4)。

MEC の乳産生能力と透過性の低い TJ 形成を誘導する (Kobayashi and Kumura, 2011; Wyszomierski *et al.*, 1999)。対照的に、STAT3 経路と NFκB 経路は乳産生や TJ バリアが下方調節される乳房炎や離乳期の際に MEC で活性化する (Bertucci *et al.*, 2010; Hughes and Watson, 2018)。そこで、D2R シグナルが MEC の乳産生能力と TJ に及ぼす影響を細胞内シグナル経路レベルで評価するため、MEC を 10 μM ドンペリドン、1.2 μM ブロモクリプチンの存在下・非存在下で 24 時間処理し、これらのシグナル分子のリン酸化レベルを調べた。ドンペリドン処理は STAT3 発現量を減少させたが、他の発現量はコントロール群と同レベルであった (図 2-10A-D)。併用処理群では、STAT5、p-GR、GR および STAT3 の発現レベルがブロモクリプチン処理群と比較して有意に増加し、コントロール群と同レベルを示した。また、全ての処理において p-NFκB または NFκB の発現レベルは変化しなかった。以上の結果より、D2R の活性化は MEC における乳産生関連シグナルの機能低下を引き起こし、その作用の一部はアゴニストにより抑制されることが示された。

2.6 D2R シグナルが MEC の TJ に及ぼす影響

泌乳期の MEC では、TJ タンパク質である CLDN3 と OCLN が主体となって強固な TJ を形成し、傍細胞経路を介した乳成分の漏出と細菌の侵入を防ぐ (Stelwagen and Singh, 2014)。一方、CLDN4 は泌乳期に発現レベルが低下し、離乳後や妊娠期における脆弱な TJ に多い (Kobayashi and Kumura, 2011)。そこで、D2R シグナルが TJ に及ぼす影響を評価するために、MEC を 10 μM ドンペリドン、1.2 μM ブロモクリプチンの存在下・非存在下で 24 時間処理し、CLDN3 および CLDN4 の発現レベルを調べた。ドンペリドン処理群における CLDN3 の発現量はコントロール群の 1.5 倍に増加したが、ブロモクリプチン処理群およびドンペリドンとブロモクリプチン併用処理群が顕著な差がみられなかった。CLDN4 の発現量はドンペリドン処理群、ブロモクリプチン処理群および併用処理群においてコントロール群の 1.5 倍に有意に増加した (図 2-11A, B)。このブロモクリプチン処理の結果は、泌乳マウスにブロモクリプチンを投与した際の CLDN3 と CLDN4 の変化と一致していた (Kobayashi *et al.*, 2016)。

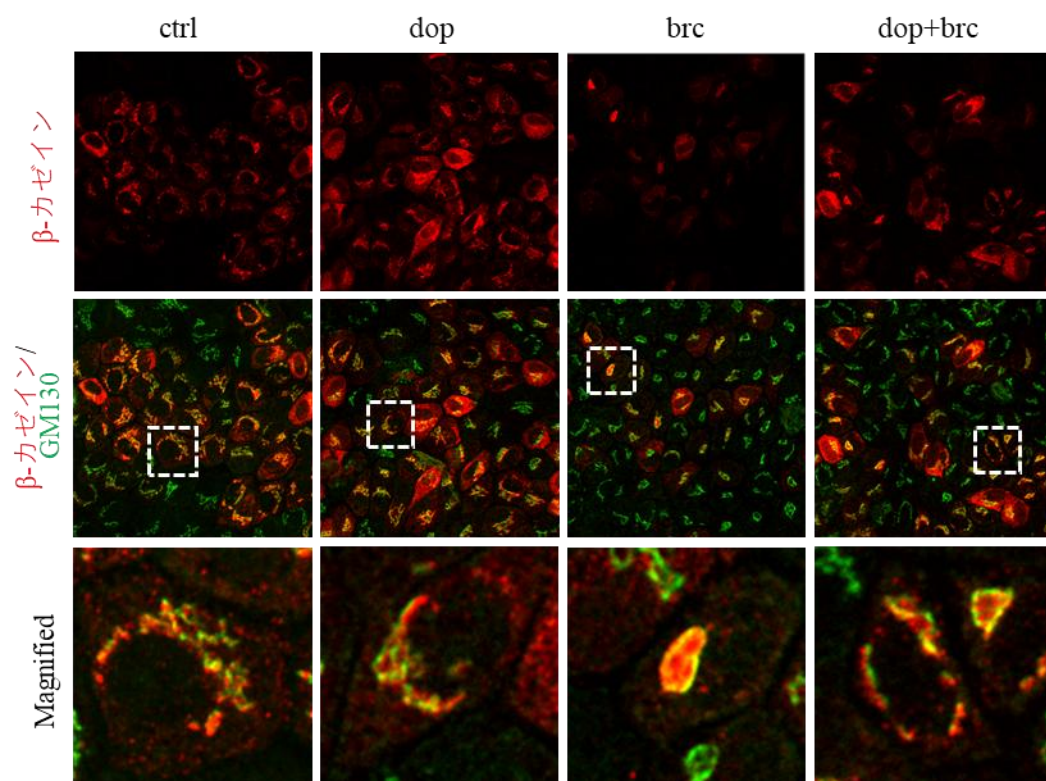


図 2-9 D2R アゴニストとアンタゴニストの併用が MEC における β -カゼインの細胞内局在とゴルジ体の形態に及ぼす影響

ドンペリドン (dop) 10 μ M、ブロモクリプチン (brc) 1.2 μ M、あるいは両方を含む分化培地で 24 時間培養した MEC における β -カゼイン (赤)および GM130 (緑)の代表的な免疫染色像を示す。マージされた画像の白い四角は拡大画像の領域、スケールバーは 25 μ m を示す。

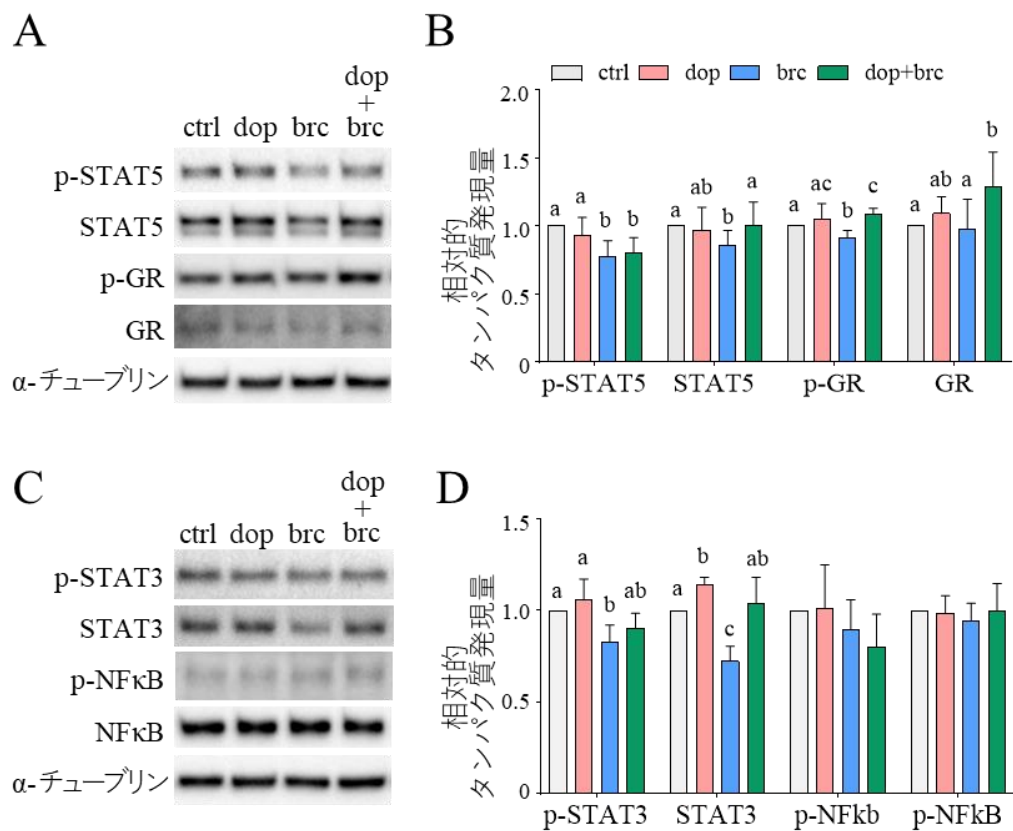


図 2-10 D2R アゴニストとアンタゴニストの併用が MEC の泌乳と炎症に関わるシグナル分子に及ぼす影響

(A–D) ドンベリドン (dop) 10 μ M、プロモクリプチン (brc) 1.2 μ M、あるいはドンベリドンとプロモクリプチンの両方を含む分化培地で 24 時間培養した MEC におけるリン酸化 STAT5 (p-STAT5)、STAT5、p-GR、GR、p-STAT3、STAT3、p-NFκB、NFκB、α-チューブリンの代表的なウェスタンブロッティング像 (A, C)、およびバンドをデンスitrometry 解析して α-チューブリンで標準化したタンパク質量のグラフを示す (B, D)。エラーバーは標準誤差、異符号間は $p < 0.05$ を示す (n = 4)。

続いて、経上皮電気抵抗 (TER)を測定することにより、TJ バリア機能に対する影響を調べた。しかし、いずれの処理群においても有意な変化は認められなかった (図 2-11C)。そこでドンペリドンとブロモクリプチンが CLDN3 と CLDN4 の局在に及ぼす影響を調べるため、免疫染色を行った。コントロール群において、CLDN3 と OCLN は MEC の細胞間隙に沿って共局在していたが、ドンペリドン処理群の CLDN3 は OCLN との共局在部位に加えて、側部細胞膜にも局在していた (図 2-11D)。さらに、ブロモクリプチン処理群では 3 つの MEC が接合する領域 (3 細胞結合領域)の近傍で CLDN3 に対するより強い陽性反応が観察され、その陽性反応は併用処理群がさらに強く観察された。CLDN4 と OCLN の免疫染色像では、コントロール群の CLDN4 と OCLN が共局在している様子が観察された。ドンペリドン処理群、ブロモクリプチン処理群および併用処理群では、側部細胞膜や細胞質にも CLDN4 の陽性反応が観察された。また、ドンペリドンとブロモクリプチン併用処理群では、3 細胞結合領域で CLDN4 の強い陽性反応が観察された。これらの結果から、D2R のアゴニストやアンタゴニストは TJ 構成タンパク質の発現および局在に影響を及ぼすが、MEC におけるバリア機能に影響しないことがわかった。

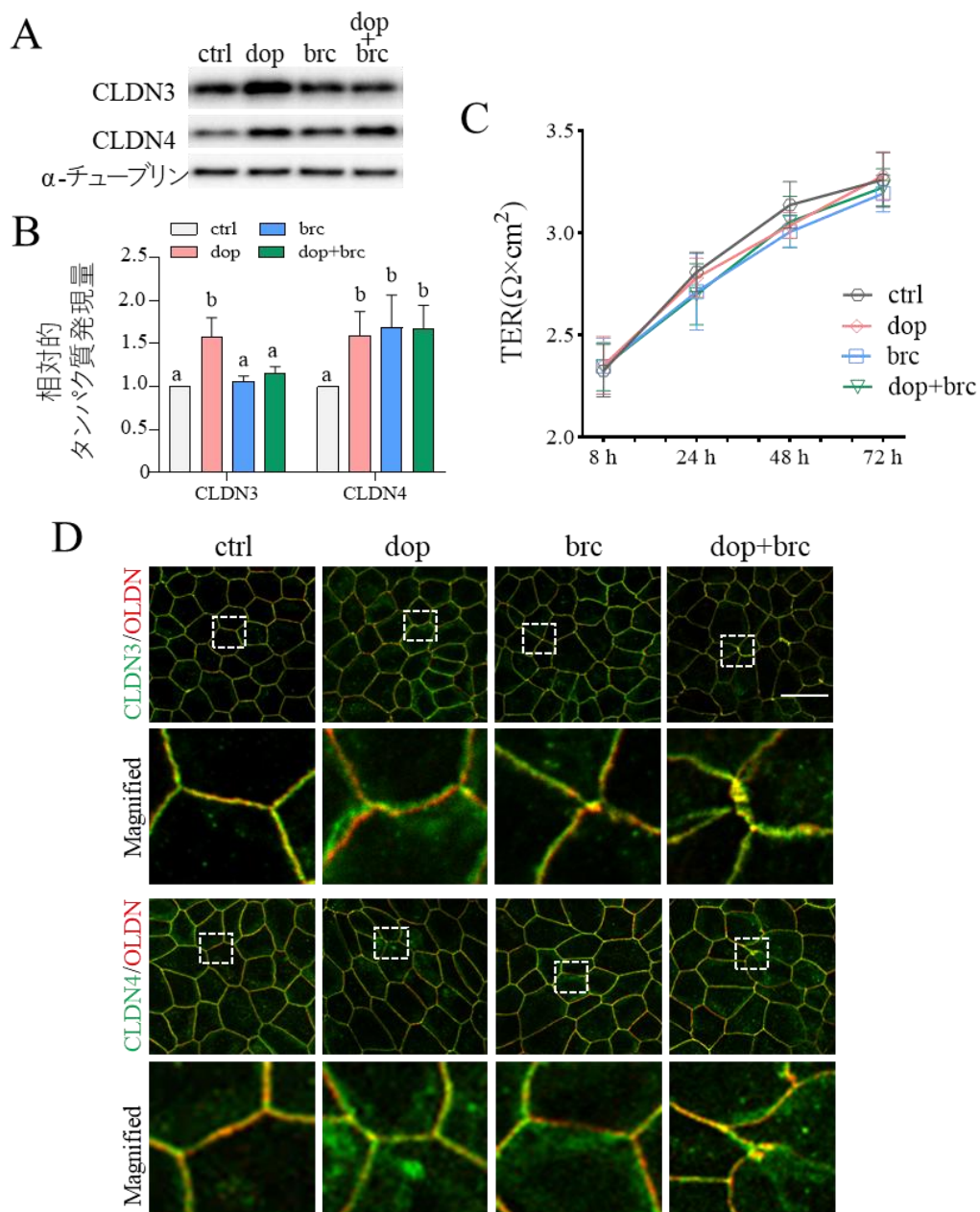


図 2-11 D2R アゴニストとアンタゴニストの併用が MEC の TJ に及ぼす影響

(A, B) ドンペリドン (dop) 10 μM 、プロモクリプチン (brc) 1.2 μM 、あるいは両方を含む分化培地で 72 時間培養した MEC における CLDN3、CLDN4、 α -チューブリンの代表的なウェスタンブロッティング像 (A)、およびバンドをデンストメトリー解析して α -チューブリンで標準化したタンパク質量のグラフを示す (B)。エラーバーは標準誤差を示す ($n=4$)。 (C) グラフはセルカルチャーインサート上で培養し、ドンペリドン 10 μM 、プロモクリプチン 1.2 μM 、あるいは両方を含む分化培地で 72 時間培養した MEC における経上皮抵抗値 (TER) の変化を示す。エラーバーは標準誤差、異符号間は $p < 0.05$ を示す ($n=6$)。 (D) ドンペリドン 10 μM 、プロモクリプチン 1.2 μM 、あるいは両方を含む分化培地で 72 時間培養した MEC における CLDN3 (緑)、CLDN4 (緑)、OCLN (赤) の代表的な免疫染色像を示す。画像の白い四角は拡大画像の領域、スケールバーは 20 μm を示す。

考察

下垂体細胞のプロラクチン分泌量はドーパミンとその受容体である D2R を介して調節されている (Leebaw *et al.*, 1978; Freeman *et al.*, 2000)。下垂体から分泌されたプロラクチンは乳腺上皮細胞の乳分泌を誘導する (Archer, 1980)。しかし、妊娠後期の乳腺では D2R の発現量が上昇することも報告されている (Farmer and Palin, 2021)。それにも関わらず、ドーパミンが MEC の D2R を介して直接的に作用するかを調べた報告例はない。そこで本研究では、まず MEC に D2R の発現パターンを確認した。その結果、TJ 近傍の細胞膜に D2R が局在していることがわかった。また、乳腺にはドーパミンが存在していること、D2R アゴニストであるブロモクリプチンが培養下の MEC において D2R 下流の cAMP 産生を促すこと (Sibley and Monsma, 1992)、D2R 下流のシグナル分子である Akt と ERK がドンペリドン処理により短時間で活性化していることも確認された (Chen *et al.*, 2012)。続いて、D2R アゴニストであるブロモクリプチンを用いた培養実験を行った結果、細胞生存性、アポトーシス、カゼイン産生、TJ 構成タンパク質発現、およびそれらを制御するシグナル分子の活性化に影響を与えていることが確認された。以上のことより、ドーパミンが MEC の D2R を介して直接的に作用し、その性状を調節する機構が妊娠後期以降の乳腺に存在すると考えられる。

本研究の結果、D2R アゴニストであるブロモクリプチンが一部の MEC にアポトーシスを誘導し、その細胞生存性を低下させることがわかった。妊娠期や退縮期における MEC の細胞生存性を調節するシグナル分子として、Akt/mTOR、ERK、STAT3、NFκB が報告されている (Yu and Cui, 2016; McCubrey *et al.*, 2007; Bertucci *et al.*, 2010; Dutta *et al.*, 2006)。また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 の発現量のバランスがアポトーシス誘導を調節することが知られている (Knudson and Korsmeyer, 1997)。本研究において、D2R アゴニスト (活性化誘導成分)であるブロモクリプチンは ERK と STAT3 の不活性化を誘導したが、Akt/mTOR や NFκB には影響を与えなかった。また、ブロモクリプチンおよびドンペリドン (D2R アゴニスト)はともにアポトーシス促進因子である BAX の発現量を増加させ、アポトーシス抑制因子である Bcl2 の発現量をそれぞれ増加、減少させた。ブロモク

リプチンがプロラクチノーマ細胞において Akt/mTOR ではなく ERK 経路を介して細胞死を誘導することが報告されている (Tang *et al.*, 2019)。以上より、D2R は ERK シグナルと BAX/Bcl2 バランスを介して MEC の細胞生存性とアポトーシス誘導を調節していると考えられる。

本研究において、D2R アゴニストであるブロモクリプチンは、STAT5 と GR の不活性化とともに、カゼインおよびラクトフェリン産生を低下させた。また、D2R アンタゴニストであるドンペリドンは、ブロモクリプチンによって引き起こされる β -カゼイン低下、STAT5 不活性化、および GR 不活性化を軽減させた。STAT5 はプロラクチンによって活性化されるシグナル分子であり、GR はグルココルチコイドによって活性化されるシグナル分子である。代表的な乳タンパク質であるカゼインは、STAT5 と GR の活性化によって発現が誘導される (Kobayashi *et al.*, 2016)。また、ラクトフェリンの発現に STAT5 や GR が関わることも報告されている (Yang *et al.*, 2025; Zheng *et al.*, 2005)。以上、D2R は MEC のカゼイン産生を STAT5 と GR の活性化を介して調節していると考えられる。また、STAT5 と GR の活性化がセカンドメッセンジャーである cAMP によって調節されることが報告されている (Pace *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2023)。D2R は G_{ai} 型 G タンパク質と共役する GPCR であり、 G_{ai} の活性化は細胞内 cAMP 蓄積を抑制する (Beaulieu *et al.*, 2015)。研究の結果においても D2R アゴニストであるブロモクリプチンが MEC の cAMP 濃度を低下させ、アンタゴニストのドンペリドンは cAMP 濃度を上昇させることが確認されている。したがって、D2R は cAMP 濃度を低下させることで STAT5 および GR シグナルを不活性化し、MEC の乳産生能を低下させる可能性が高い。

本研究において D2R アゴニストであるブロモクリプチンは TJ 構成タンパク質である CLDN3 と CLDN4 の発現量を増加させ、D2R アンタゴニストであるドンペリドンは CLDN4 を増加させた。また、ブロモクリプチンとドンペリドンは CLDN3 の局在パターンの乱れを引き起こした。泌乳期の MEC は CLDN3 を主体として強固な TJ を形成し、離乳期や炎症時における MEC は CLDN4 の発現を増加させ、脆弱な TJ を形成する (Kobayashi and Kumura, 2011)。以上のことから D2R の活性化と不活性化は TJ のバリア機能を低下すると考えられ

る。しかし、本研究において TJ バリア機能を評価するために行った経上皮電気抵抗値の実験ではプロモクリプチンとドンベリドンの影響は認められなかった。近年の研究により、MEC の TJ が CLDN3 や CLDN4 だけではなく、CLDN8 によっても構成されていることがわかって いる (Hou et al., 2010)。また、本研究においてプロモクリプチン処理群では 3 つの MEC が接 合する領域 (3 細胞結合領域) の近傍で CLDN3 に対するより強い陽性反応が観察され、その 陽性反応は併用処理群がさらに強く観察された。この 3 細胞結合領域には CLDN とはことな る TJ 構成タンパク質である Tricellulin や Angulin-1 が局在することが知られている (Sugawara et al., 2021; Mariano et al., 2011)。したがって、D2R の活性化と不活性化がこれらの TJ 構成タンパク質に及ぼす影響を調べる必要がある。

プロモクリプチンは D2R を介して下垂体細胞のプロラクチン分泌を抑制し、泌乳期乳腺の 乳産生を抑制することが知られている (Rowther et al., 2010)。しかし、本研究の結果より泌乳 期の MEC には D2R が発現しており、プロモクリプチンは MEC の D2R を介して直接的に乳 産生を調節する経路があることがわかった。また、D2R の活性化は STAT5 や GR の不活性化 を介して MEC の乳タンパク質産生を抑制すること、ERK シグナルの不活性化を介してアポ トーシス誘導を引き起こすこともわかった。以上の研究結果は、D2R とドーパミンが泌乳期 MEC において乳産生を抑制的に調節する因子として機能することを示している。しかし、本 研究において培養下の MEC はドーパミン合成能力を有するにも関わらず、培地中に分泌する ドーパミン量は検出レベル以下であった。一方で生体の乳腺にはドーパミンが十分に存在し ていた。泌乳期の乳腺においては MEC 以外の細胞がドーパミンを分泌し、MEC の D2R を介 して乳産生を調節している可能性がある。

結論

MEC における TJ 近傍の細胞膜に D2R が局在している。MEC が興奮性神経伝達物質であ るドーパミンを自律的に産生し、D2R を介して細胞内 cAMP 濃度を変化させ、cAMP シグナ ルを中心とした経路で自身の生存性や機能性を調節する機構を有している。

第三章 乳腺上皮細胞における GABA シグナルの役割

序文

GABA (γ -アミノ酪酸)は、中枢神経系における代表的な抑制性神経伝達物質であり、シナプス後細胞の過分極を介して神経興奮性を抑制する役割を果たしている。従来、GABA は中枢神経に特異的な神経伝達物質と考えられてきたが、近年の研究により GABA は末梢組織にも広く分布し、免疫系、膵臓、消化管、気道、肝臓など、多様な臓器で生理的な役割を有することが明らかになっている (Tanaka, 1985; Ong and Kerr, 1990; Soltani *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2015; Chapman *et al.*, 1991)。末梢組織における GABA は局所的なオートクライン・パラクライン因子として機能し、細胞増殖、代謝、炎症応答、分泌調節などの調節に関わっていると報告されている (Wang *et al.*, 1984; Untereiner *et al.*, 2020; Lu and Inman, 2009; Torres *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2013)。すなわち、GABA は単なる神経伝達物質としての役割を超えて、全身の末梢組織における恒常性維持に関わる多機能性分子として捉えることができる。

GABA 受容体を大別すると、GABA_A 受容体および GABA_B 受容体の 2 種類に分類される。GABA_A 受容体は Cl⁻チャネルを形成するイオンチャネル型受容体であり、GABA 結合により活性化した GABA_A 受容体は細胞内に Cl⁻を流入させ、膜電位を急速に変化させる (Stein and Nicoll, 2003; Ma *et al.*, 2012)。一方、GABA_B 受容体は細胞内で G_i タンパク質と結合する G タンパク質共役型受容体であり、アデニル酸シクラーゼの抑制を介して cAMP 産生を低下させ、Ca²⁺やジアシルグリセロールなどのセカンドメッセンジャーの調節も行い、比較的緩徐かつ持続的に細胞内のシグナル伝達を調節する役割を担っている (Wise *et al.*, 1999; Obrietan and van den Pol, 1997)。このように、GABA は GABA_A 受容体を介した Cl⁻イオン動態と GABA_B 受容体を介したセカンドメッセンジャーの調節という様式の異なる 2 つの受容体を通じて細胞機能を制御し、組織特異的に多様な生理応答を誘導していると考えられている。

これまでの細胞レベルの先行研究において、GABA_A 受容体が細胞内の Cl⁻濃度変化を介して多様な調節作用を行っていることが報告されている。例えば、膵島 β 細胞の GABA_A 受

容体は Cl⁻流入を介して膜電位と Ca²⁺流入量を変化させ、インスリン分泌と細胞増殖を調節している (Untereiner *et al.*, 2020)。免疫細胞では、細胞内 Cl⁻濃度の上昇が NFκB 活性、サイトカイン産生、細胞の活性化状態を調節し、炎症や自己免疫反応の抑制に寄与することが示されている (Koumangoye, 2022; Yang *et al.*, 2012)。上皮細胞では Cl⁻ダイナミクスが細胞収縮性や細胞間接着、上皮バリア機能を調節し、上皮組織の恒常性維持に不可欠な役割を果たす (Deng *et al.*, 2023; Conn *et al.*, 2024)。これらの知見は Cl⁻チャネルである GABA_A 受容体が多種多様な細胞や器官で生理的な役割を担っていることを示している。しかし、泌乳期の乳腺における GABA_A 受容体の役割は未だ不明である。

MEC は、妊娠末期から授乳期にかけて増加するプロラクチンとグルココルチコイドと結合して STAT5 経路と GR 経路を活性化し、乳タンパク質の産生と強固な TJ 形成を同時に開始する (Kobayashi *et al.*, 2016)。これらの分化過程には、セカンドメッセンジャーである Ca²⁺や cAMP と同様に、細胞内 Cl⁻濃度の調節が不可欠であると考えられている。なぜなら、MEC には CFTR や NKCC1 などの Cl⁻輸送体が発現しており、これらの膜タンパク質が細胞内 Cl⁻濃度のみならず、乳汁中の Cl⁻濃度も調節していることが報告されているからである (Gögelein, 1988; Narayanan *et al.*, 2020)。また、細胞内と乳中の Cl⁻濃度は乳管の膨張、細胞極性、TJ バリアの維持にも関わっている (Gögelein, 1988; O'Grady and Lee, 2003)。したがって、授乳期の MEC において Cl⁻イオンの流入に関わる GABA_A 受容体は細胞内や乳中のイオン濃度を調節し、なおかつ MEC の乳分泌や TJ バリアに関与している可能性があると考えられる。

近年の医学領域の研究により、乳がんと GABA シグナルの密接な関りが報告されている (Sizemore *et al.*, 2014; Neman *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014)。また、前述したように泌乳期の MEC は細胞内と乳中の Cl⁻を調節する機構を有し、細胞内外の Cl⁻濃度が MEC の性状を調節していることが報告されている (Linzell and Peaker, 1971)。しかし、泌乳期の正常な MEC における GABA と Cl⁻チャネルである GABA_A 受容体の生理的役割はわかっていない。本研究では、MEC の GABA 合成能、GABA_A 受容体と GABA_B 受容体の発現、および GABA_A

受容体の活性化と不活性化が細胞内 Cl⁻濃度、細胞生存性、乳タンパク質分泌、TJ 形成に与える影響を包括的に調べた。本研究の目的は MEC における Cl⁻依存的 GABA シグナルの生理的役割を示し、泌乳期の MEC における乳分泌の調節機構の一端を明らかにすることである。

結果

3.1 乳腺上皮細胞は GABA を産生する

GABA は、L-グルタミンからグルタミン酸脱炭酸酵素(glutamic acid decarboxylase、GAD)によって合成され、GABA トランスポーター (GABA transporter、GAT)を介して細胞外に分泌される (図 3-1A)。また、GAT は GABA を再吸収し、細胞外の GABA 濃度を調節する役割も果たしている (Scimemi, 2014)。本研究では、MEC の GABA 産生能力を検証するため、マウス乳腺組織および培養 MEC における GAD と GAT の発現を調べた。RT-PCR 解析の結果、ポジティブコントロールのマウス脳では GAD のサブタイプである *Gad1*、*Gad2*、*Gad3*、および *Gat1* の発現が確認された (図 3-1B)。また、*Gad1* と *Gad2*、および *Gat1* の mRNA はバージンマウスの乳腺組織と乳腺組織から単離した MEC、および培養した MEC においても検出された (図 3-1B)。

続いて、MEC が実際に GABA を産生・分泌するかを明らかにするため、脳、乳腺の抽出液とともに、乳分泌を誘導する分化培地で 72 時間培養した MEC の細胞内画分および培地上清中の GABA 濃度を測定した。その結果、ポジティブコントロールの脳抽出液では 1700 ppm を超える濃度の GABA が確認された。また、乳腺組織の抽出液からも 400 ppm の GABA が検出された。MEC の細胞内画分では GABA 濃度は測定限界 (50 ppm)未満であったが、培地上清中では約 200 ppm の GABA が検出され、MEC が GABA を合成し、細胞内に蓄えずに細胞外へ分泌していることが確認された (図 3-1C)。

これらの結果より、MEC は GABA 合成酵素を発現し、細胞外に GABA を分泌する能力を備えていることが示された。

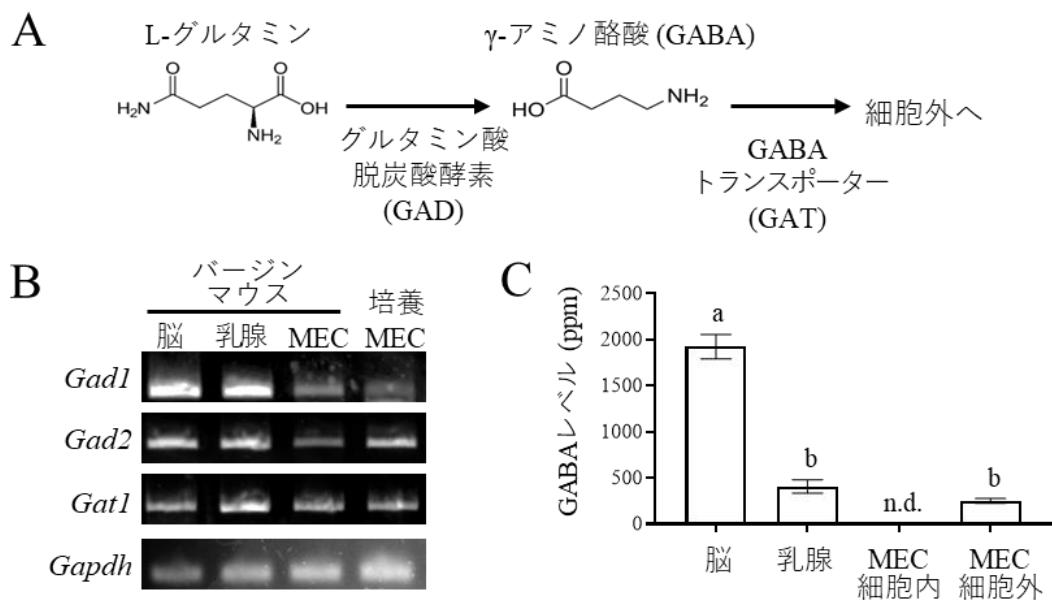


図 3-1 MEC における GABA の産生

(A) 生体内での GABA の L-グルタミン合成経路。 (B) バンドは、バージンマウスの脳、乳腺、乳腺から単離した MEC および培養モデルの MEC における GABA 合成酵素 (*Gad1*, *Gad2*)、GABA トランスポーター (*Gat1*) と *Gapdh* の mRNA 発現を RT-PCR で検出したアガロース電気泳動像を示す。 (C) 脳、乳腺、MEC の細胞内および細胞外における GABA 濃度を比較した。Not Detected (n.d.) は不検出を表す。エラーバーは標準誤差を示す (n=3)。

3.2 乳腺上皮細胞は GABA_A 受容体を発現する

GABA_A 受容体は、 α (1-6)、 β (1-3)、 γ (1-3)、 δ 、 ϵ 、 π 、 θ などの複数のサブユニットから構成される五量体型のイオンチャネルである (Sigel and Steinmann, 2012) (図 3-2A)。特に β 1-3 サブユニットは機能的な GABA_A 受容体の形成に必須であるため、これらの発現を検出することによって GABA_A 受容体の存在を確認することができる。そこで GABA_A 受容体の β サブユニットである *Gabrb1*、*Gabrb2*、*Gabrb3* の mRNA 発現を調べた。RT-PCR 解析の結果、マウス脳組織では *Gabrb1*、*Gabrb2*、*Gabrb3* の発現が確認された。また、GABA_B 受容体を構成する二つのサブユニット *Gabbr1* および *Gabbr2* も検出された (図 3-2B)。一方、バージンマウス由来の乳腺から単離した MEC は、GABA_A 受容体の β サブユニットである *Gabrb1*、*Gabrb2*、*Gabrb3* と GABA_B 受容体の *Gabbr1* サブタイプが確認されたが、*Gabbr2* は検出されなかった。また、培養モデルの乳産生能を誘導した MEC では GABA_A 受容体の β サブユニットの *Gabrb1*、*Gabrb2*、*Gabrb3* は検出されたが、GABA_B 受容体のサブユニット発現はどちらも確認されなかった (図 3-2B)。これらの結果から、MEC における GABA シグナル伝達は主として GABA_A 受容体を介して行われている可能性が高い。

3.3 MEC における GABA_A 受容体の活性化

GABA_A 受容体には GABA の結合部位に加え、ベンゾジアゼピン結合部位やバルビツール酸結合部位など複数のアロステリック部位が存在する (図 3-2A)。これらの部位に結合する薬物は GABA_A 受容体の立体構造を変化させ、GABA に対する親和性を正または負に調節することで、GABA_A 受容体の活性化を増強または抑制することが知られている (Sieghart, 2015)。また、ピクロトキシンは GABA_A 受容体の Cl⁻を通過させるチャネル構造部分を塞ぐブロッカーであり、Cl⁻の流入を遮断する (Olsen, 2006)。本研究では、これらの結合部位を標的とする薬理的刺激により、GABA_A 受容体活性の変動を誘導できるかを解析した。

まず、GABA_A 受容体が MEC の細胞内に Cl⁻を流入させることを確認するため、Cl⁻チャネルとしての機能を阻害する薬剤であるピクロトキシン存在下で細胞内 Cl⁻の動態を観察した。なお、細胞内 Cl⁻の可視化は Cl⁻によって蛍光が消光される性質を有し、蛍光強度が細胞

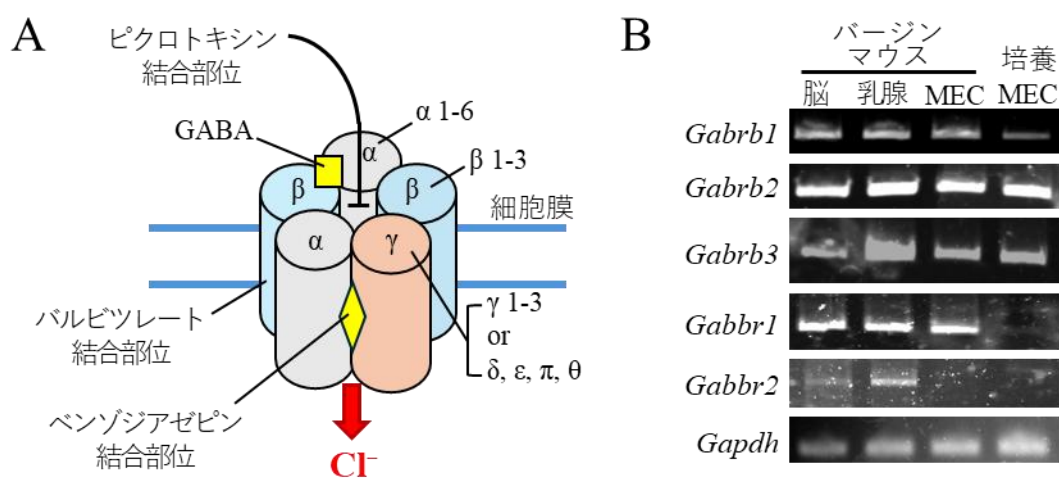


図 3-2 MEC における GABA 受容体の発現

(A) GABA_A 受容体複合体の模式図。GABA の結合部位、Cl⁻チャンネル、各薬物の作用部位を示す。(B) バンドはバージンマウスの脳、乳腺、乳腺から単離した MEC および培養モデルの MEC における GABA_A 受容体 (*Gabrb1*, *Gabrb2*, *Gabrb3*)、GABA_B 受容体 (*Gabbr1*, *Gabbr2*)と *Gapdh* の mRNA 発現を RT-PCR で検出したアガロース電気泳動像を示す。

内 Cl⁻濃度に逆比例して変化する色素である MQAE を用いて行った (Verkman *et al.*, 1989)。MQAE で標識した MEC の培地にピクロトキシンを添加し、その後の蛍光変化を観察した結果、ピクロトキシンの添加後 30 分間の蛍光強度が増加し、細胞内 Cl⁻濃度が低下していることが確認された (図 3-3A)。

続いて、GABA_A 受容体を正に調節するアロステリック調節薬であるジアゼパム (dzp) が GABA_A 受容体の下流にあるシグナル分子である Akt、ERK、p38 を活性化に影響することを確認するため (Pakkhesal, 2024; Wang *et al.*, 2005)、1 μ M dzp 存在下で 10 分間、1 時間、3 時間培養した MEC における Akt、ERK、p38 のリン酸化レベルをウェスタンブロットで調べた。その結果、p-Akt は処理 10 分後に一過的に減少し、その後時間依存的に回復した (図 3-3B, C)。一方、p-ERK および p-p38 は 10 分後に一過的に上昇し、その後回復した。以上、MEC の GABA_A 受容体特異的なアロステリック薬剤である dzp や Cl⁻チャネル阻害剤であるピクロトキシんに短時間で反応し、Cl⁻動態と下流シグナルを即時的に変化させることから、MEC には機能的な GABA_A 受容体が発現していることが示された。

3.4 GABA_A 受容体のアロステリック調節薬が MEC に及ぼす影響

3.4.1 GABA_A 受容体のアロステリック調節薬が細胞生存性に及ぼす影響

GABA_A 受容体の活性化が MEC の細胞生存性に与える影響を調べるため、正のアロステリック調節薬ジアゼパムおよび負のアロステリック調節薬フルマゼニル (fmn)を用いた検証を行った (図 3-4A)。WST-8 アッセイによって細胞生存性を調べた結果、高濃度ジアゼパム群 (5 μ M, 15 μ M)の細胞生存性がコントロールと比較して有意に低下していた (図 3-4B)。

続いて、フルマゼニルを 0.3–30 μ M 濃度で含む増殖培地で 48 時間培養し、WST-8 アッセイをした結果、高濃度フルマゼニル群 (3–15 μ M)の細胞生存性がコントロールと比較して有意に低下していることが確認された (図 3-4C)。

以上の結果に基づき、以降の培養実験では細胞生存性に影響しない 1 μ M のフルマゼニルと 1 μ M ジアゼパムで処理を行った。

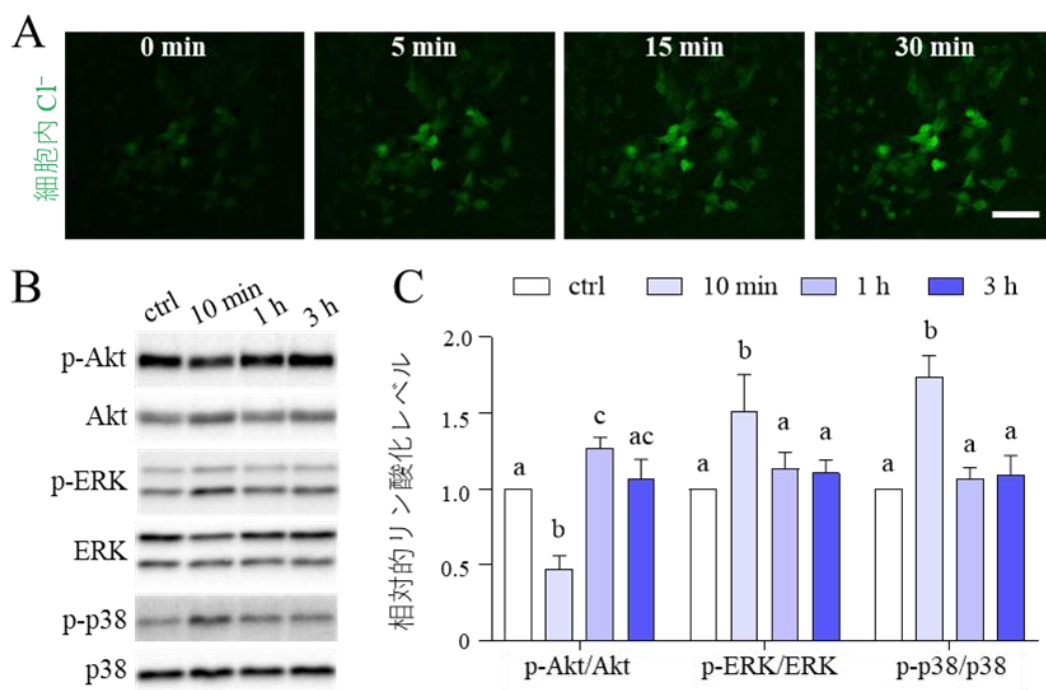


図 3-3 MEC における GABA_A 受容体の活性化

(A) GABA_A 受容体の塩素イオン (Cl^-)流入阻害剤であるピクロトキシン 5 μM を含む分化培地で 30 分培養した MEC における細胞内 Cl^- のライブイメージング像。 (B, C) GABA_A 受容体作動薬であるジアゼパム 1 μM を含む分化培地で 10 分間、1 時間、3 時間培養した MEC におけるリン酸化 Akt (p-Akt)、Akt、p-ERK、ERK、p-p38、p38 および α -チューブリンの代表的なウェスタンブロッティング像を (B)、およびバンドをデンストメトリー解析して算出したリン酸化レベルのグラフを示す (C)。エラーバーは標準誤差、異符号間には $p < 0.05$ を示す ($n = 3$)。

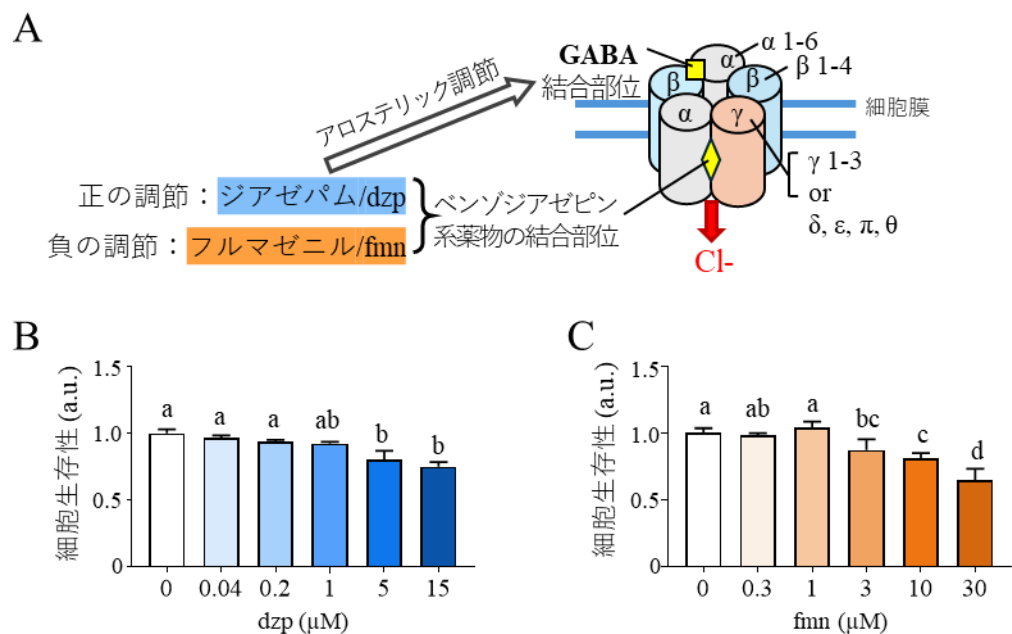


図 3-4 GABA_A 受容体作動薬および拮抗薬の細胞毒性試験

(A) GABA_A 受容体作動薬のジアゼパム (dzp)と拮抗薬のフルマゼニル (fmn)の結合部位を示す。dzp 5 μM(B)あるいは fmn 10 μM(C)を含む増殖培地で 48 時間培養した MEC の細胞生存性を示す。エラーバーは標準誤差、異符号間は $p < 0.05$ を示す ($n = 5$)。

3.4.2 GABA_A 受容体のアロステリック調節薬がアポトーシスに及ぼす影響

GABA_A 受容体シグナルは神経細胞において細胞死を制御することが知られている (Xu *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2007)。そこで、GABA_A 受容体のアロステリック調節薬である 1 μ M のジアゼパムと 1 μ M フルマゼニルの存在下で 72 時間培養した MEC をアポトーシスマーカーである cleaved caspase-3 で免疫染色した (図 3-5A)。その結果、コントロール群および処理群の一部の MEC で cleaved caspase-3 に対する陽性反応が観察された。一定面積の細胞層における cleaved caspase-3 陽性細胞数をカウントすると、フルマゼニルおよびジアゼパム処理群において cleaved caspase-3 陽性細胞数がコントロール群よりも有意に増加した (図 3-5B)。一方、フルマゼニルとジアゼパム併用処理した群ではアポトーシス誘導が抑制され、cleaved caspase-3 陽性細胞数はコントロール群と同レベルであった。

3.4.3 GABA_A 受容体のアロステリック調節薬が細胞生存性に関わるシグナル伝達経路に及ぼす影響

図 3-4 と図 3-5 の結果において GABA_A 受容体の正と負のアロステリック調節薬は細胞生存性を低下させ、アポトーシスを誘導した。この反応が細胞内シグナル経路レベルで起きることを確認するため、ジアゼパム 1 μ M、フルマゼニル 1 μ M、あるいは両方を含む分化培地で 72 時間処理した細胞における細胞生存性のシグナル分子、Akt および ERK のリン酸化割合を調べた (McCubrey *et al.*, 2007) Akt リン酸化レベルはジアゼパム処理群においてコントロール群よりも有意に低下し、フルマゼニルとジアゼパムの併用処理群ではコントロール群と同レベルであった (図 3-6A, B)。ERK リン酸化レベルはジアゼパム処理群において有意に上昇し、フルマゼニルとジアゼパム併用処理群ではコントロールと同程度の値を示した。

続いて、アポトーシス誘導に関わるタンパク質である BAX と抗アポトーシスタンパク質である Bcl2 の発現量を調べた (Knudson and Korsmeyer, 1997)。フルマゼニル単独処理では、BAX 発現量の増加と Bcl2 の減少が認められた (図 3-6A, C)。一方、ジアゼパム処理群では BAX に有意な変化はなかったが、Bcl2 発現量は減少した。フルマゼニルとジアゼパム併用処

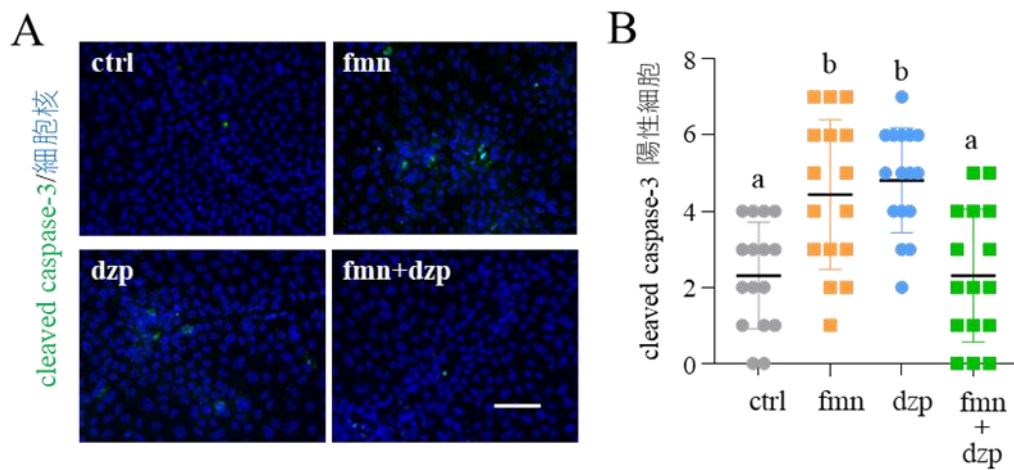


図 3-5 GABA_A 受容体作動薬および拮抗薬が MEC のアポトーシスに及ぼす影響

(A) GABA_A 受容体作動薬のジアゼパム (dzp) 1 μ M、拮抗薬のフルマゼニル (fmn) 1 μ M、あるいは両方を含む分化培地で 72 時間培養した MEC における cleaved caspase-3 (緑色)の代表的な免疫染色像を示す。スケールバーは 50 μ m、青は DAPI で染色された核を示す。(B) グラフは一定面積の cleaved caspase-3 の免疫染色画像でカウントされた陽性細胞数を示す。エラーバーは標準誤差、異符号間には $p < 0.05$ を示す ($n = 16$)。

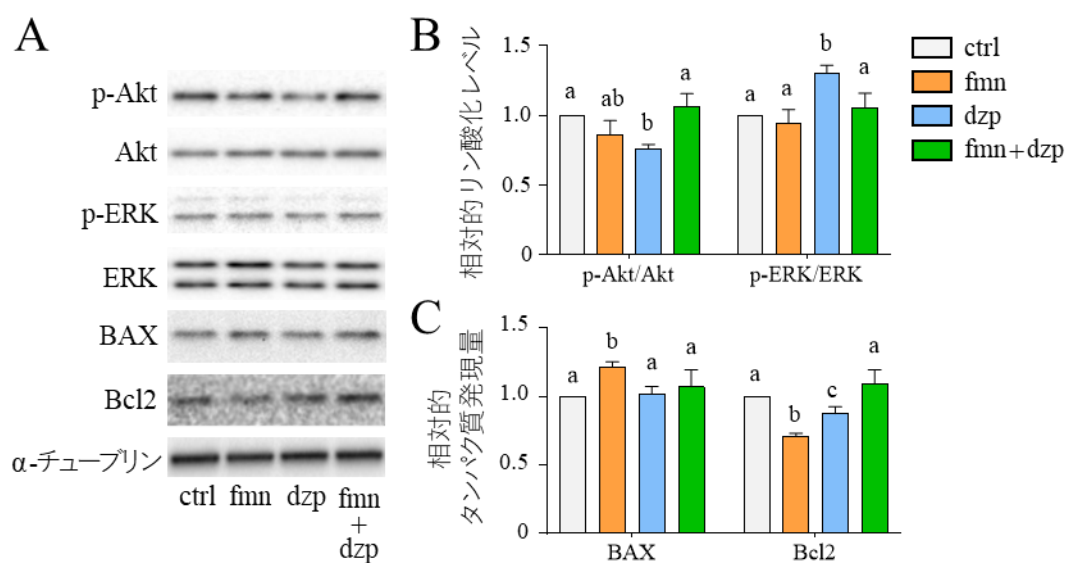


図 3-6 GABA_A 受容体の活性化や不活性化が MEC の細胞生存性に関わるシグナル分子に及ぼす影響

(A–C) フルマゼニル (fnn) 1 μ M、ジアゼパム (dzp) 1 μ M、あるいは両方を含む分化培地で 72 時間処理した MEC におけるリン酸化 Akt (p-Akt)、Akt、p-ERK、ERK、BAX、Bcl2、 α -チューブリンの代表的なウェスタンブロットティング像 (A)、およびバンドをデンストメトリー解析して算出したリン酸化レベルあるいは α -チューブリンで標準化したタンパク質量のグラフを示す (B, C)。エラーバーは標準誤差、異符号間は $p < 0.05$ を示す ($n = 3$)。

理群ではコントロールと同レベルまで回復した (図 3-6C)。

これらの結果から、アロステリック調節薬を介した GABA_A 受容体の過剰な活性化・不活性化は細胞生存性のシグナル分子である ERK と Akt の活性化レベルを変化させ、BAX や Bcl2 の発現量を乱すことによってアポトーシスを促進することが示唆された。

3.4.4 GABA_A 受容体のアロステリック調節薬が MEC の乳タンパク質産生に及ぼす影響

GABA_A 受容体シグナルが乳タンパク質産生に与える影響を調べるため、MEC をジアゼパム (1、5 μ M)あるいはフルマゼニル (1、5 μ M)を含む分化培地で 72 時間培養し、細胞内および培地中に分泌された α -カゼインと β -カゼインをウェスタンブロットとそのバンドのデンストメトリー解析で調べた。その結果、ジアゼパム処理群の MEC では細胞内および培地中に分泌された α -カゼインと β -カゼインはいずれも濃度依存的に減少した (図 3-7A, B)。また、フルマゼニル処理群の MEC では細胞内 α -カゼインが 1 μ M のフルマゼニル存在下において、培地中 β -カゼインはフルマゼニル 1 μ M と 5 μ M 存在下でコントロール群の 20%程度に減少した (図 3-7C, D)。

続いて MEC をフルマゼニル 1 μ M とジアゼパム 1 μ M を含む分化培地で 72 時間培養し、正と負のアロステリック調節薬の中和反応を確認する実験を行った。その結果、フルマゼニルとジアゼパム併用処理群では、フルマゼニルとジアゼパムを単独処理した場合と比べて、細胞内と培地中 β -カゼイン量の減少が部分的に回復することがわかった (図 3-8A, B)。 β -カゼインは乳タンパク質の主成分であり、ゴルジ体で翻訳後修飾を受けてカゼインミセルを形成することを報告されている (Chanat *et al.*, 1999)。そこで、 β -カゼインの細胞内局在をゴルジ体マーカーの GM130 とともに免疫染色により観察した。コントロール群では β -カゼインの強い陽性反応が GM130 陽性部位と重なっている様子が観察された (図 3-8C)。同様の局在パターンはフルマゼニル処理群でも確認された。一方、ジアゼパム処理群では β -カゼインの陽性反応が細胞層全体で弱まり、GM130 陽性のゴルジ体のサイズも縮小している様子であった。しかし、フルマゼニルとジアゼパム併用処理群では、ジアゼパム処理による影響が軽減し、 β -カゼインと GM130 の局在パターンはコントロール群に類似していた。

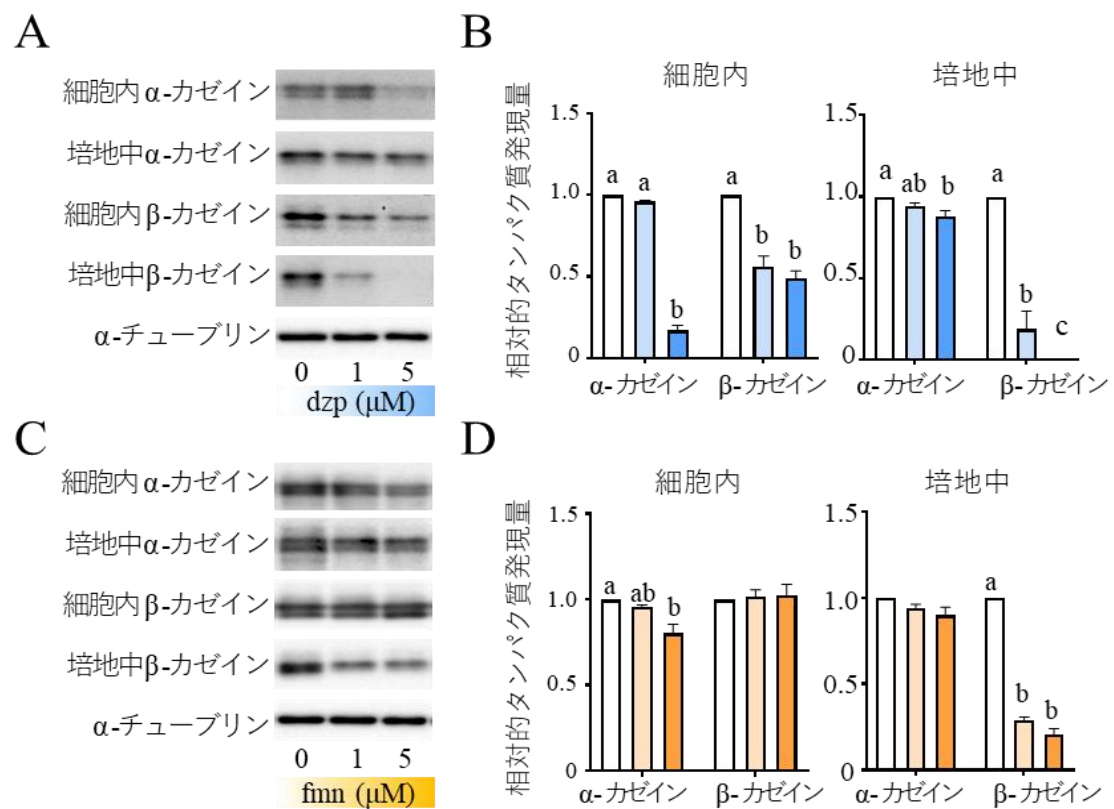


図 3-7 GABA_A 受容体作動薬および拮抗薬が MEC の乳タンパク質産生に及ぼす影響

(A–D) GABA_A 受容体作動薬のジアゼパム (dzp) 1 μ M、5 μ M あるいは拮抗薬のフルマゼニル (fmn) 1 μ M、5 μ M を含む分化培地で 72 時間培養した MEC における細胞内および培地中に分泌された α -カゼイン、 β -カゼイン、 α -チューブリンの代表的なウェスタンブロットティング像 (A, C)、およびバンドをデンストメトリー解析して α -チューブリンで標準化したタンパク質量のグラフを示す (B, D)。エラーバーは標準誤差、異符号間には $p < 0.05$ を示す ($n = 4$)。

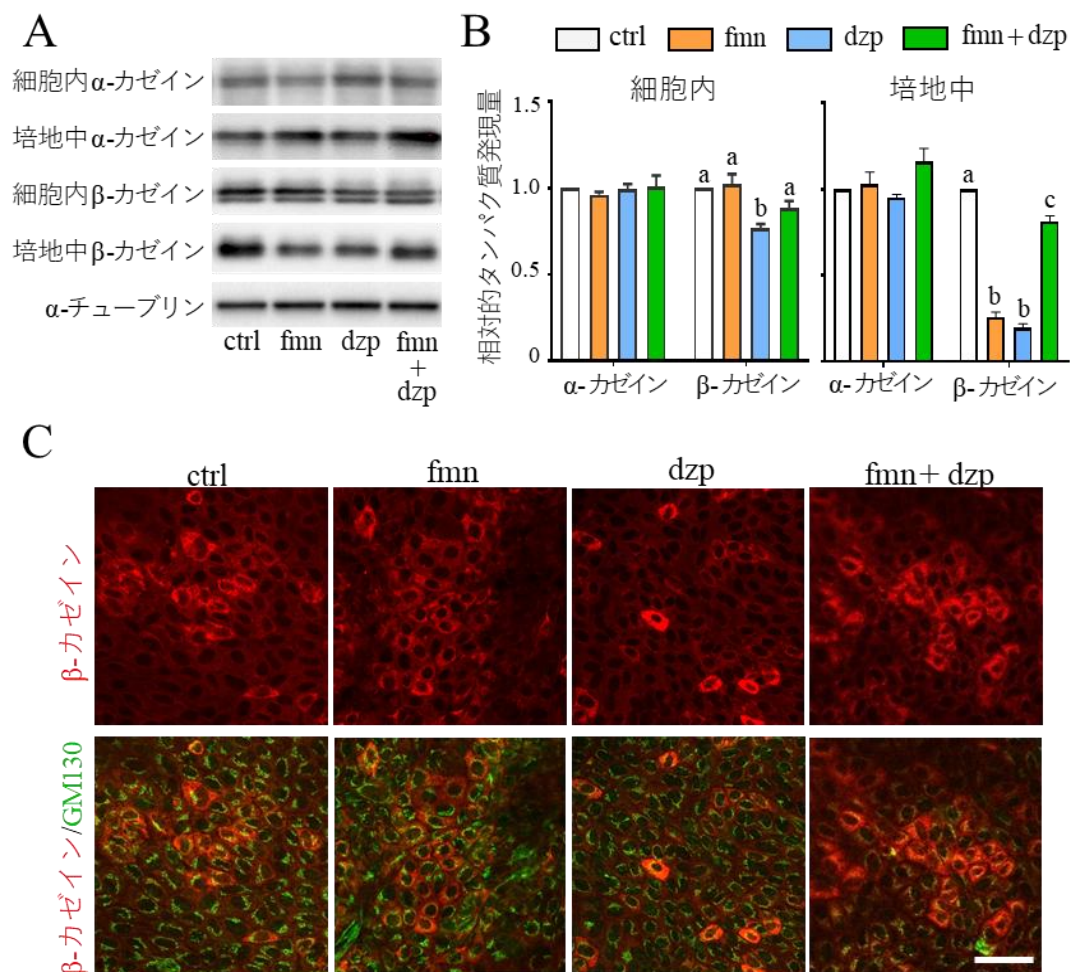


図 3-8 GABA_A 受容体作動薬と拮抗薬同時処理が MEC の乳タンパク質産生に及ぼす影響
(A–C) GABA_A 受容体作動薬のジアゼパム (dzp) 1 μ M と拮抗薬のフルマゼニル (fnm) 1 μ M 、あるいは両方を含む分化培地で 72 時間処理した MEC における細胞内および培地中に分泌された α -カゼイン、 β -カゼイン、 α -チューブリンの代表的なウェスタンブロッティング像(A)、およびバンドをデンストメトリ解析して α -チューブリンで標準化したタンパク質量のグラフを示す (B)。エラーバーは標準誤差、異符号間は $p < 0.05$ を示す ($n = 3$)。 (C) β -カゼイン (赤)および GM130 (緑)の代表的な免疫染色像を示す。スケールバーは 25 μ m を示す。

3.4.5 GABA_A 受容体のアロステリック調節薬が MEC の泌乳と炎症に関わるシグナル伝達経路に及ぼす影響

分娩前後の乳腺において、グルココルチコイドはそれぞれ STAT5 経路と GR 経路を活性化し、MEC の乳分泌能力と透過性の低い TJ 形成を誘導する (Kobayashi *et al.*, 2016)。また、図 3-8 におい GABA_A 受容体のアロステリック調節薬であるフルマゼニルとジアゼパムはカゼイン産生を抑制した。そこでフルマゼニルとジアゼパムのカゼイン抑制作用が STAT5 と GR を介した反応であるかを調べるため、STAT5 と GR のリン酸化レベルを調べた。その結果、フルマゼニルとジアゼパムの単独処理はいずれも p-STAT5/STAT5 を低下させ、STAT5 活性を抑制した (図 3-9A, B)。一方、フルマゼニルとジアゼパム併用処理群では p-STAT5 のリン酸化レベルはコントロール以上であった。GR のリン酸化レベルはフルマゼニル単独処理でコントロール群と比較して大きな変化はなかったが、ジアゼパム単独処理またはフルマゼニルとの併用処理群では p-GR/GR が上昇した。

乳房炎や離乳期の乳腺において、STAT3 経路と NFκB 経路の活性化が MEC の乳産生や TJ バリアを下方調節する (Hughes and Watson, 2018; Bertucci *et al.*, 2010)。また、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ (Mitogen-activated Protein Kinase, MAPK) ファミリーである p38 および JNK も炎症性サイトカインによって活性化し、その活性化が MEC のカゼイン分泌を抑制することも報告されている (Kobayashi *et al.*, 2022)。そこでフルマゼニルとジアゼパムで処理した MEC においてこれらの炎症性シグナル分子が活性化しているかを調べるため、MEC をジアゼパム 1 μM、フルマゼニル 1 μM あるいは両方を含む分化培地で 72 時間培養し、これらのシグナル分子のリン酸化レベルをウェスタンブロットとそのバンドのデンシトメトリー解析で調べた。その結果、STAT3、NFκB および JNK のリン酸化レベルはいずれの群でもコントロール群と比べて変化を示さなかった (図 3-10A, B)。一方、p38 リン酸化レベルはジアゼパム単独処理で有意に上昇し、GABA_A 受容体の過剰な活性化が p38 経路を刺激することがわかった (図 3-10A, C)。

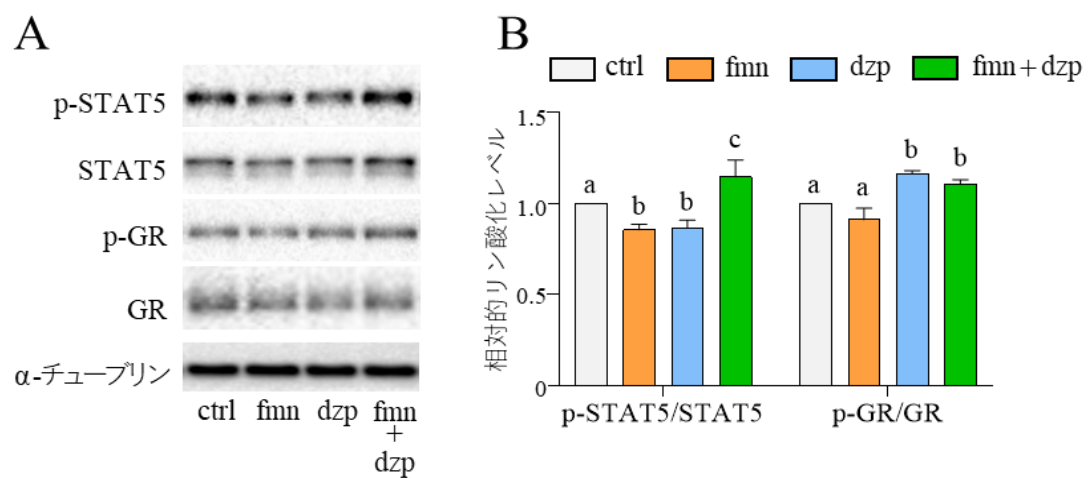


図 3-9 GABA_A 受容体作動薬および拮抗薬が MEC の泌乳に関わるシグナル分子に及ぼす影響

(A, B) GABA_A 受容体作動薬のジアゼパム (dzp) 1 μ M、拮抗薬のフルマゼニル (fnn) 1 μ M、あるいは両方を含む分化培地で 72 時間処理した MEC におけるリン酸化 STAT5 (p-STAT5)、STAT5、p-GR、GR、 α -チューブリンの代表的なウェスタンブロッティング像 (A)、およびバンドをデンストメトリー解析して算出したリン酸化レベルのグラフを示す (B)。エラーバーは標準誤差、異符号間には $p < 0.05$ を示す ($n = 3$)。

3.4.6 GABA_A 受容体のアロステリック調節薬が MEC の TJ に及ぼす影響

泌乳期の MEC では、TJ タンパク質である CLDN3 と OCLN が主体となって強固な TJ を形成し、傍細胞経路を介した乳成分の漏出と細菌の侵入を防ぐ (Stelwagen and Singh, 2014; Kobayashi *et al.*, 2013)。一方、CLDN4 は泌乳期に発現量が減少し、離乳後や妊娠期における脆弱な TJ に多い (Kobayashi and Kumura, 2011)。そこで、フルマゼニル 1 μ M、ジアゼパム 1 μ M、あるいは両方を含む分化培地で 72 時間処理した MEC におけるこれらの TJ 構成タンパク質の発現パターンおよび TJ バリア機能を調べた。その結果、CLDN3 および CLDN4 の発現量はいずれの処理群でもコントロールと同程度であり、GABA_A 受容体のアロステリック調節薬による影響は認められなかった (図 3-11A, B)。

また、経上皮電気抵抗 (TER) の測定により TJ のバリア機能を調べたところ、すべての処理群で TER 値は培養日数の経過に伴って上昇し、コントロール群との間に違いは認められなかった (図 3-11C)。免疫染色による TJ タンパク質の局在解析では、CLDN3 と OCLN はコントロール群とフルマゼニル群で細胞間隙に沿って均一に局在していたが、ジアゼパム群では CLDN3 の局在が細胞質にも顆粒状に観察された (図 3-11D)。しかし、フルマゼニルとジアゼパムの併用処理群ではこの細胞質に局在する CLDN3 が減少している様子であった。CLDN4 の局在はいずれの処理群においてもコントロール群と同様に側部細胞膜に局在している様子が観察された。以上より、アロステリック調節薬による GABA_A 受容体の活性化および不活性化は CLDN3 の軽微な局在変化を除き、TJ 構成タンパク質の発現パターンや TJ バリア機能には大きな変化を引き起こさないことがわかった。

3.5 GABA_A 受容体を介した Cl⁻流入阻害が MEC に及ぼす影響

GABA_A 受容体は Cl⁻透過型イオンチャネルとして機能し、細胞内 Cl⁻濃度の調節を介して細胞機能を制御することが知られている (Sieghart, 1992)。そこで、GABA_A 受容体が MEC の Cl⁻濃度変化を介して細胞生存性や乳タンパク質産生に影響を与えているかを調べるため、Cl⁻チャネル阻害剤であるピクロトキシン (pct) を用いた培養実験を行った。

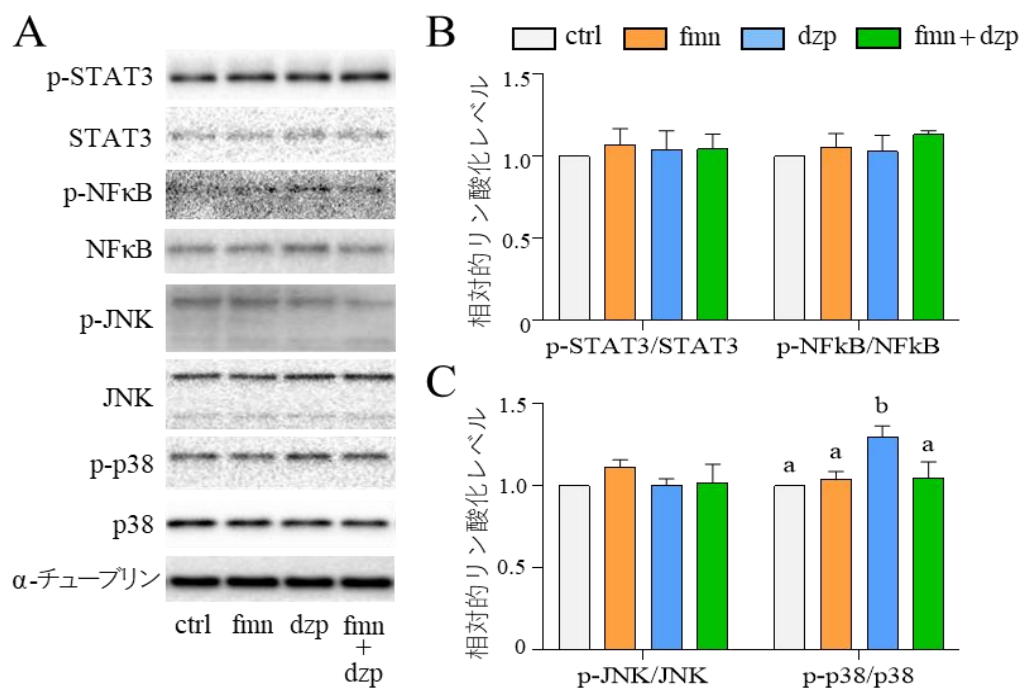


図 3-10 GABA_A 受容体作動薬および拮抗薬が MEC の炎症に関わるシグナル分子に及ぼす影響

(A–C) GABA_A 受容体作動薬のジアゼパム (dzp) 1 μM、拮抗薬のフルマゼニル (finn) 1 μM、あるいは両方を含む分化培地で 72 時間処理した MEC における p-STAT3、STAT3、p-NFκB、NFκB、p-JNK、JNK、p-p38、p38、α-チューブリン の代表的なウェスタンブロッティング像 (A)、およびバンドをデンスitrometry解析して算出したリン酸化レベルのグラフを示す (B, C)。エラーバーは標準誤差、異符号間では $p < 0.05$ を示す (n = 3)。

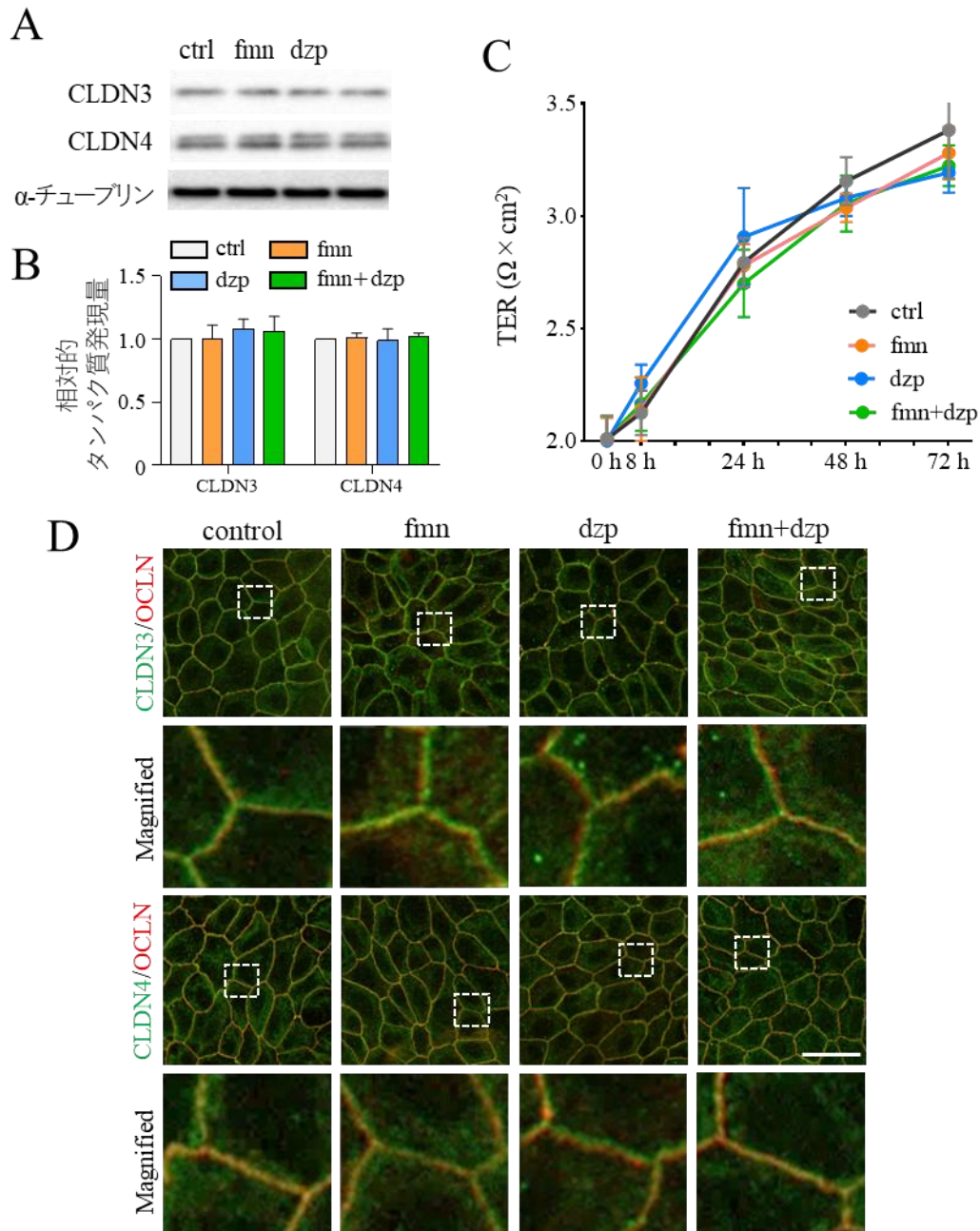


図 3-11 GABA_A 受容体作動薬および拮抗薬が MEC における TJ 構成タンパク質の発現に及ぼす影響

(A, B, D) GABA_A 受容体作動薬のジアゼパム (dzp) 1 μM 、拮抗薬のフルマゼニル (finn) 1 μM 、あるいは両方を含む分化培地で 72 時間処理した MEC における CLDN3、CLDN4、 α -チューブリンの代表的なウェスタンブロッティング像 (A)、バンドをデンシトメトリー解析して α -チューブリンで標準化したグラフ (B)、および免疫染色像 (CLDN3; 緑、CLDN4; 緑、OCN; 赤)を示す。免疫染色像の白い四角は拡大画像の領域、スケールバーは 20 μm を示す。(C) 1 μM finn、1 μM dzp、あるいは両方を含む分化培地で 2 時間処理した MEC における経上皮抵抗値 (TER)の経時的な変化を示す。エラーバーは標準誤差、異符号間は $p < 0.05$ を示す (B: $n = 3$, C: $n = 6$)。

まず、ピクロトキシン処理が MEC の細胞生存性に与える影響を調べた。5 μ M のピクロトキシンを含む増殖培地で 48 時間培養した MEC を位相差顕微鏡で観察すると、細胞層の一部で敷石状の形態が乱れている様子が観察された (図 3-12A)。WST-8 アッセイの結果、1 μ M 以上のピクロトキシン存在下で細胞生存性が有意に低下していた (図 3-12B)。

3.5.1 GABA_A 受容体を介した Cl⁻流入阻害が MEC のアポトーシスと細胞生存に関わるシグナル伝達経路に及ぼす影響

MEC における細胞内 Cl⁻濃度の変化が細胞死および細胞内シグナル分子の活性化に与える影響を明らかにするため、Cl⁻チャネル阻害剤であるピクロトキシンを用いて細胞内への Cl⁻流入を抑制する実験とともに、GABA_A 受容体の正のアロステリック調節薬であるジアゼパムを併用してピクロトキシンの抑制作用を軽減する培養実験を行った。

まず、アポトーシスマーカーである cleaved caspase-3 の免疫染色を行ったところ、ピクロトキシンおよびジアゼパムの処理群の細胞層では cleaved caspase-3 陽性細胞が観察され、一定面積あたりの cleaved caspase-3 陽性細胞数も有意に増加していた (図 3-13A, B)。一方、ピクロトキシンとジアゼパムの併用処理群では陽性細胞数が減少し、コントロール群との間に有意な差は認められなかった (図 3-13B)。

続いて、細胞生存性に関連するシグナル分子への影響を調べるため、Akt と ERK のリン酸化レベル、およびアポトーシス関連タンパク質 BAX、Bcl2 の発現量を調べた。p-Akt/Akt はピクロトキシンとジアゼパムの処理群で低下したが、併用処理群ではコントロール群に近いレベルに回復した (図 3-13C, D)。p-ERK/ERK はピクロトキシンおよびジアゼパム処理群で上昇したが、併用群ではその上昇が部分的に抑制された。また、ジアゼパム処理群では BAX 量の減少と Bcl2 の増加が引き起こされており、ピクロトキシンとの併用処理により BAX 量は増加、Bcl2 量は減少に転じた (図 3-13C, E)。以上の結果より、MEC における GABA_A 受容体のアロステリック部位の活性化と Cl⁻チャネルの遮断は MEC の生存性に密接に関わっていると考えられる。

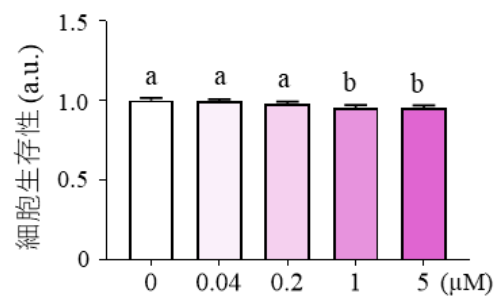


図 3-12 GABA_A 受容体の Cl⁻流入阻害剤が細胞生存性に及ぼす影響

GABA_A 受容体の Cl⁻流入阻害剤であるピクロトキシン (pct) 5 μM を含む増殖培地で 48 時間培養した MEC の細胞生存性の相対値を示す。エラーバーは標準誤差、異符号間は $p < 0.05$ を示す ($n = 4$)。

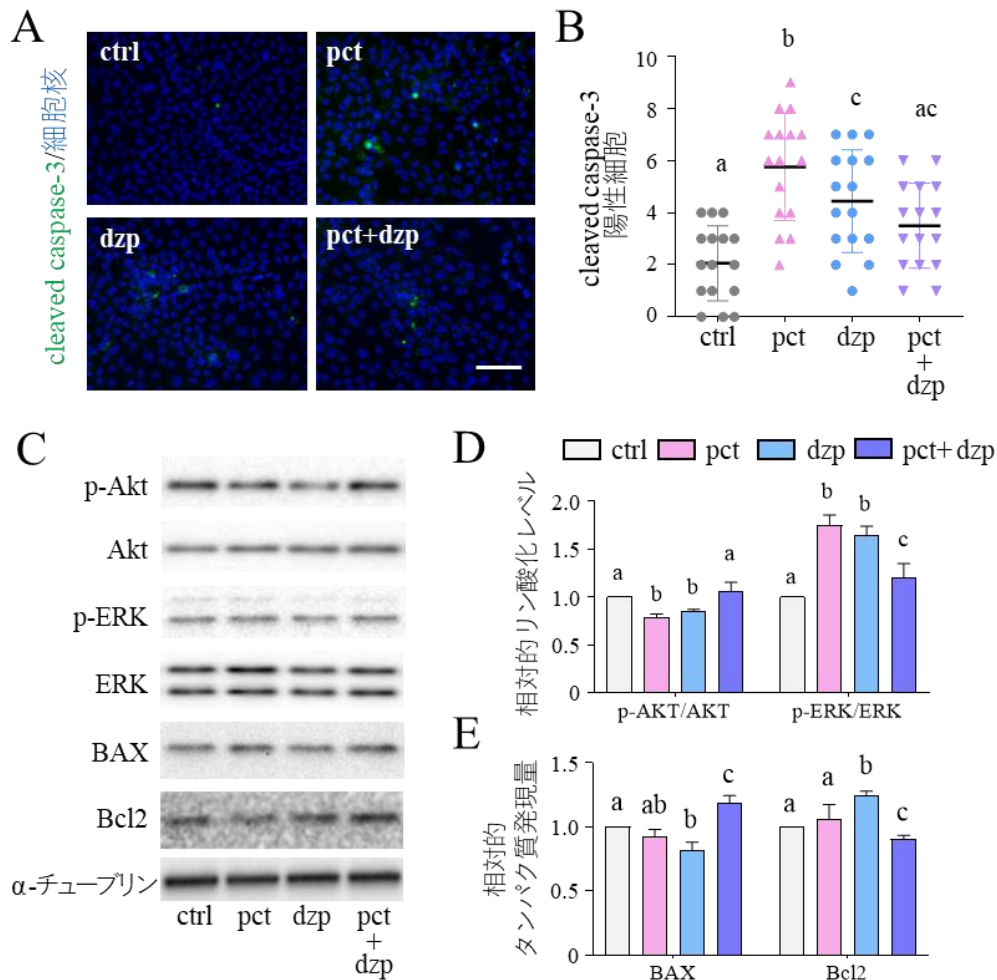


図 3-13 GABA_A 受容体の Cl⁻流入阻害剤が MEC のアポトーシスと細胞生存性に関わるシグナル分子に及ぼす影響

(A) GABA_A 受容体の Cl⁻流入阻害剤であるピクロトキシン (pct) 1 μ M、GABA_A 受容体作動薬のジアゼパム (dzp) 1 μ M、あるいは両方を含む分化培地で 72 時間処理した MEC における cleaved caspase-3 (緑色)の代表的な免疫染色像 (A)、その画像でカウントされた一定面積内の cleaved caspase-3 陽性細胞数のグラフ (B)、および MEC におけるリン酸化 Akt (p-Akt)、Akt、p-ERK、ERK、BAX、Bcl2、 α -チューブリンの代表的なウェスタンブロッティング像 (C)、およびバンドをデンストメトリー解析して算出したリン酸化レベルあるいは α -チューブリンで標準化したタンパク質量のグラフを示す (D, E)。スケールバーは 50 μ m、青は DAPI で染色された核を示す。エラーバーは標準誤差、異符号間は $p < 0.05$ を示す (B: n = 16; D, E: n = 3)。

3.5.2 GABA_A 受容体を介した Cl⁻流入阻害が MEC の乳タンパク質産生に及ぼす影響

MEC の細胞内 Cl⁻濃度が乳タンパク質産生に与える影響を明らかにするため、ピクロトキシン 1 μ M、ジアゼパム 1 μ M、あるいはピクロトキシンとジアゼパムの両方を含む分化培地で 72 時間培養し、細胞内および培地中の α -カゼインと β -カゼインの発現量をウェスタンブロットとそのバンドのデンストメトリー解析で調べた。細胞内および培地中に分泌された α -カゼイン量はいずれの処理群でもコントロール群と同レベルであった (図 3-14A, B)。一方、細胞内 β -カゼインはピクロトキシン存在下でコントロール群との有意差は認められず、ジアゼパム存在下でコントロール群の半分以下に減少した。ピクロトキシンとジアゼパム併用処理群ではジアゼパムによる細胞内 β -カゼイン量の減少が回復し、コントロール群に近い値を示した。培地中に分泌された β -カゼイン量は、ピクロトキシンおよびジアゼパム単独処理群においてコントロール群の半分以下であり、ピクロトキシンとジアゼパム併用処理群では分泌量が増加し、コントロールを上回るレベルに達した。

続いて、 β -カゼインの細胞内局在を調べるため、 β -カゼインとゴルジ体マーカーである GM130 の免疫染色を行った (図 3-14C)。コントロール群とピクロトキシン処理群の細胞層において、 β -カゼインは GM130 陽性のゴルジ体領域に局在している様子が観察された。ジアゼパム処理群では、ゴルジに局在する β -カゼインの陽性反応が弱まった。一方、ジアゼパムとピクロトキシンの併用処理群ではジアゼパムの影響が軽減している様子が観察された。以上の結果より、MEC における GABA_A 受容体のアロステリック部位の活性化と Cl⁻チャネルの遮断は MEC の β -カゼイン産生に重要な役割を果たしていると考えられる。

3.5.3 GABA_A 受容体を介した Cl⁻流入阻害が MEC の泌乳と炎症に関わるシグナル伝達経路に及ぼす影響

MEC における細胞内 Cl⁻濃度が泌乳関連のシグナル伝達経路に及ぼす影響を明らかにするため、ピクロトキシン 1 μ M、ジアゼパム 1 μ M、あるいは両方を含む分化培地で 72 時間処理し、STAT5 と GR のリン酸化レベルをウェスタンブロットとそのバンドのデンストメトリー解析で調べた。STAT5 リン酸化レベルは、ジアゼパム単独処理で有意に低下したが、ピクロ

トキシシンとジアゼパム併用処理群ではコントロール群よりも有意に上昇していた (図 3-15A, B)。GR のリン酸化レベルは、ピクロトキシシン、ジアゼパム処理群で上昇し、併用群でコントロール群と同レベルを示した。

続いて、MEC における細胞内 Cl^- 濃度が MEC の炎症性シグナル伝達経路に及ぼす影響を調べた。MEC をピクロトキシシン $1\ \mu\text{M}$ 、ジアゼパム $1\ \mu\text{M}$ あるいは両方を含む分化培地で 72 時間処理し、炎症性のシグナル分子である STAT3、NF κ B、p38 と JNK のリン酸化レベルをウェスタンブロットとそのバンドのデンストメトリー解析で調べた。STAT3 のリン酸化レベルは、ピクロトキシシン処理により有意に上昇し、ジアゼパムとの併用処理においてもそのレベルはコントロール群よりも高かった (図 3-16A, B)。NF κ B のリン酸化レベルは、ピクロトキシシン処理により有意に低下したが、ジアゼパムとの併用処理によりコントロール群と同レベルに回復した。MAPK 経路の炎症性シグナル分子である JNK と p38 のリン酸化レベルはピクロトキシシン処理により有意に上昇した (図 3-16A, C)。ジアゼパム処理においても p38 のリン酸化レベルはコントロール群よりも有意に上昇していたが、ピクロトキシシンとジアゼパムの併用処理群ではコントロール群と同レベルに変化した。以上のことから、GABA $_A$ 受容体を介した細胞内 Cl^- 濃度上昇が炎症関連のシグナル分子である STAT3、JNK、p38 の活性化を抑制していると考えられる。

3.5.4 GABA $_A$ 受容体を介した Cl^- 流入阻害が MEC の TJ に及ぼす影響

MEC における細胞内 Cl^- 濃度が TJ に及ぼす影響を検討するため、ピクロトキシシン $1\ \mu\text{M}$ 、ジアゼパム $1\ \mu\text{M}$ 、あるいは両方を含む分化培地で 72 時間処理し、TJ 構成タンパク質の発現と局在、およびそのバリア機能の変化を調べた。

CLDN3 および CLDN4 のタンパク質量は、いずれの処理群でもコントロール群と同程度であり、 Cl^- 流入阻害による影響は認められなかった (図 3-17A, B)。続いて、TER による TJ バリア機能の評価を行った。ピクロトキシシン処理群では処理 8 時間後に TER が大幅に向上し、TJ バリアが一過性に強まることが確認された (図 3-17C)。しかし、ピクロトキシシン処理 24 時間後以降の TER はコントロール群と同レベルであり、ジアゼパムの併用処理においても同

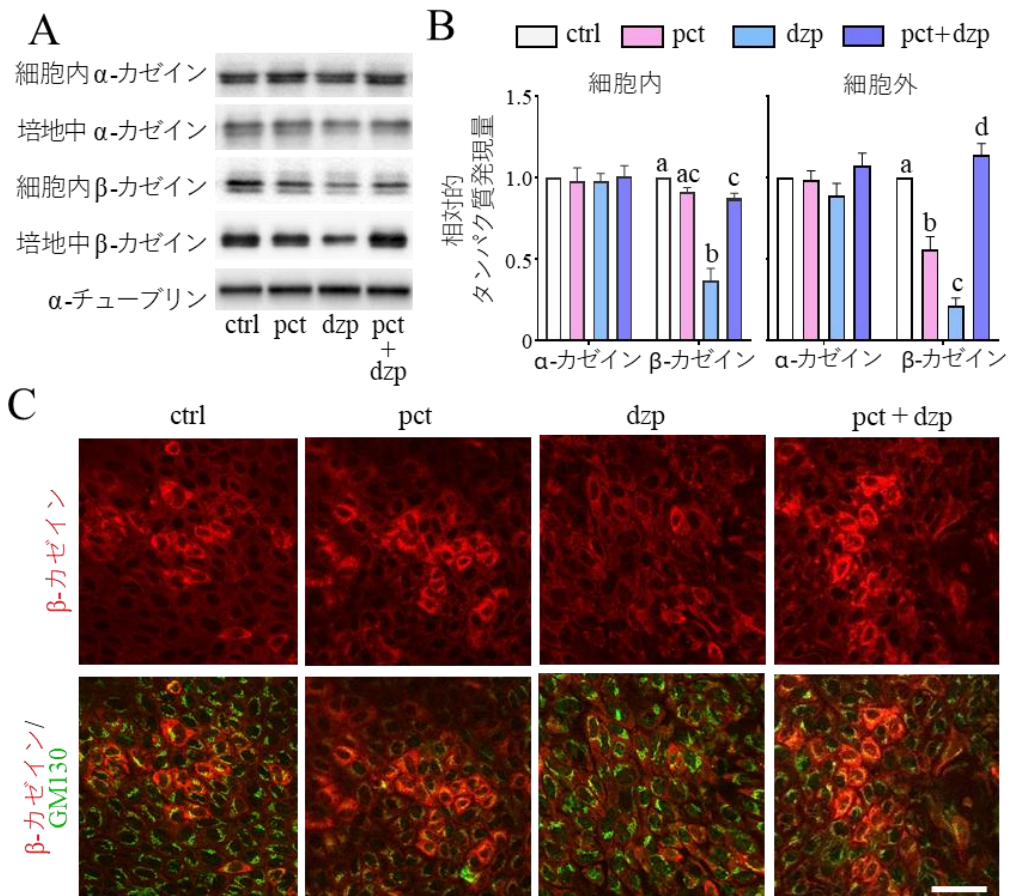


図 3-14 GABA_A 受容体の Cl⁻流入阻害剤が MEC の乳タンパク質産生に及ぼす影響

(A–C) GABA_A 受容体の Cl⁻流入阻害剤であるピクロトキシン (pct) 1 μM、GABA_A 受容体作動薬のジアゼパム (dzp) 1 μM、あるいは両方を含む分化培地で 72 時間処理した MEC における細胞内および培地中に分泌された α-カゼイン、β-カゼイン、α-チューブリンの代表的なウェスタンブロッティング像 (A)、およびバンドをデンストメトリー解析して α-チューブリンで標準化したタンパク質量のグラフを示す (B)。エラーバーは標準誤差、異符号間には $p < 0.05$ を示す ($n = 3$)。 (C) β-カゼイン (赤)および GM130 (緑)の代表的な免疫染色像を示す。スケールバーは 25 μm を示す。

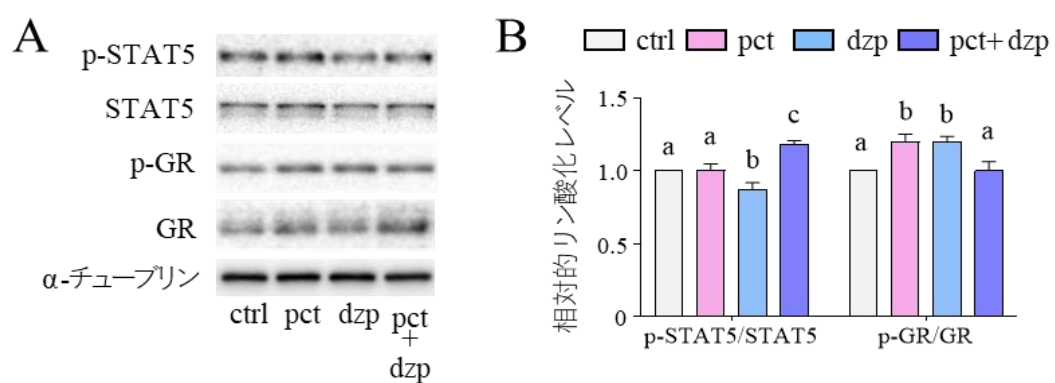


図 3-15 GABA_A 受容体の Cl⁻流入阻害剤が MEC の泌乳に関わるシグナル分子に及ぼす影響

(A, B) GABA_A 受容体の Cl⁻流入阻害剤であるピクロトキシン (pct) 1 μM、GABA_A 受容体作動薬のジアゼパム (dzp) 1 μM、あるいは両方を含む分化培地で 72 時間処理した MEC におけるリン酸化 STAT5 (p-STAT5)、STAT5、p-GR、GR、α-チューブリンの代表的なウェスタンブロッティング像 (A)、およびバンドをデンストメトリー解析して算出したリン酸化レベルのグラフを示す (B)。エラーバーは標準誤差、異符号間には $p < 0.05$ を示す ($n = 3$)。

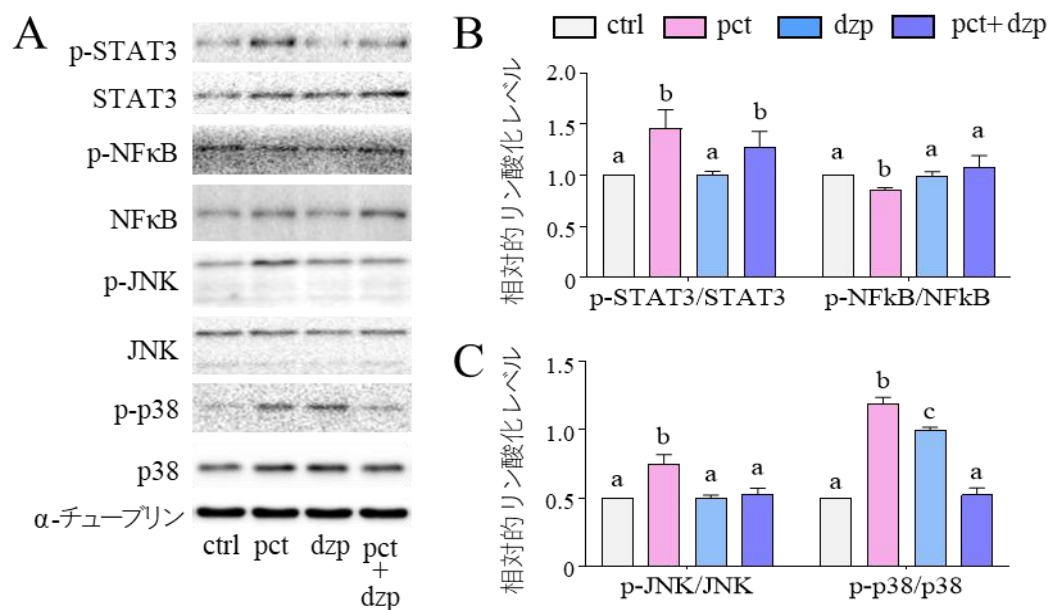


図 3-16 GABA_A 受容体の Cl⁻流入阻害剤が MEC の炎症に関わるシグナル分子に及ぼす影響
 (A–C) GABA_A 受容体の Cl⁻流入阻害剤であるピクロトキシン (pct) 1 μ M 、GABA_A 受容体作動薬のジアゼパム (dzp) 1 μ M 、あるいは両方を含む分化培地で 72 時間処理した MEC における p-STAT3、STAT3、p-NFκB、NFκB、p-JNK、JNK、p-p38、p38、 α -チューブリンの代表的なウェスタンブロッティング像 (A)、およびバンドをデンスitrometry解析して算出したリン酸化レベルのグラフを示す (B, C)。エラーバーは標準誤差、異符号間は $p < 0.05$ を示す ($n = 3$)。

様の結果であった。CLDN3、CLDN4、OCLN の局在を免疫染色で観察したところ、いずれの処理群においても CLDN3 と CLDN4 は OCLN で示される細胞間隙の TJ 領域に局在している様子が観察された (図 3-17D)。また、ピクロトキシン処理群とジアゼパム処理群においては CLDN3 が細胞質にも顆粒状に観察され、その局在はピクロトキシン処理群においてジアゼパム処理群よりも顕著であった。しかし、ピクロトキシンおよびジアゼパムの併用処理群においては細胞質の顆粒状の CLDN3 局在はほとんど観察されなくなった。

3.6 GABA の合成阻害が MEC の乳産生に及ぼす影響

図 3-1 において培養中の MEC が培地中に GABA を分泌することが確認された。この MEC における GABA 分泌の抑制が乳産生に与える影響を調べるため、GABA の生合成を抑制する L-アリルグリシン存在下で 5 日間培養した (Rodríguez de Lores *et al.*, 1971)。L-アリルグリシン非存在下で培地交換を行わずに 5 日間培養すると、培地中の GABA 濃度が時間依存的に増加していた (図 3-18A)。しかし、L-アリルグリシン存在下では培養 2 日後の時点まで GABA は検出レベル外であり、その後も 100 ppm 以下で推移していた。また、L-アリルグリシン非存在下において、培地中の GABA 濃度が培地交換に伴ってリセットされ、その後に増加することもわかった。これら 3 種類の培養条件で培養した MEC における細胞内の α -カゼインと β -カゼインの発現量をウェスタンブロットとそのバンドのデンストメトリー解析で調べた。その結果、細胞内の α -カゼイン量はいずれの条件においても同レベルであったが、細胞内 β -カゼイン量は L-アリルグリシン存在下で増加し、定期的な培地交換も細胞内 β -カゼイン量を増加させることがわかった (図 3-18B, C)。

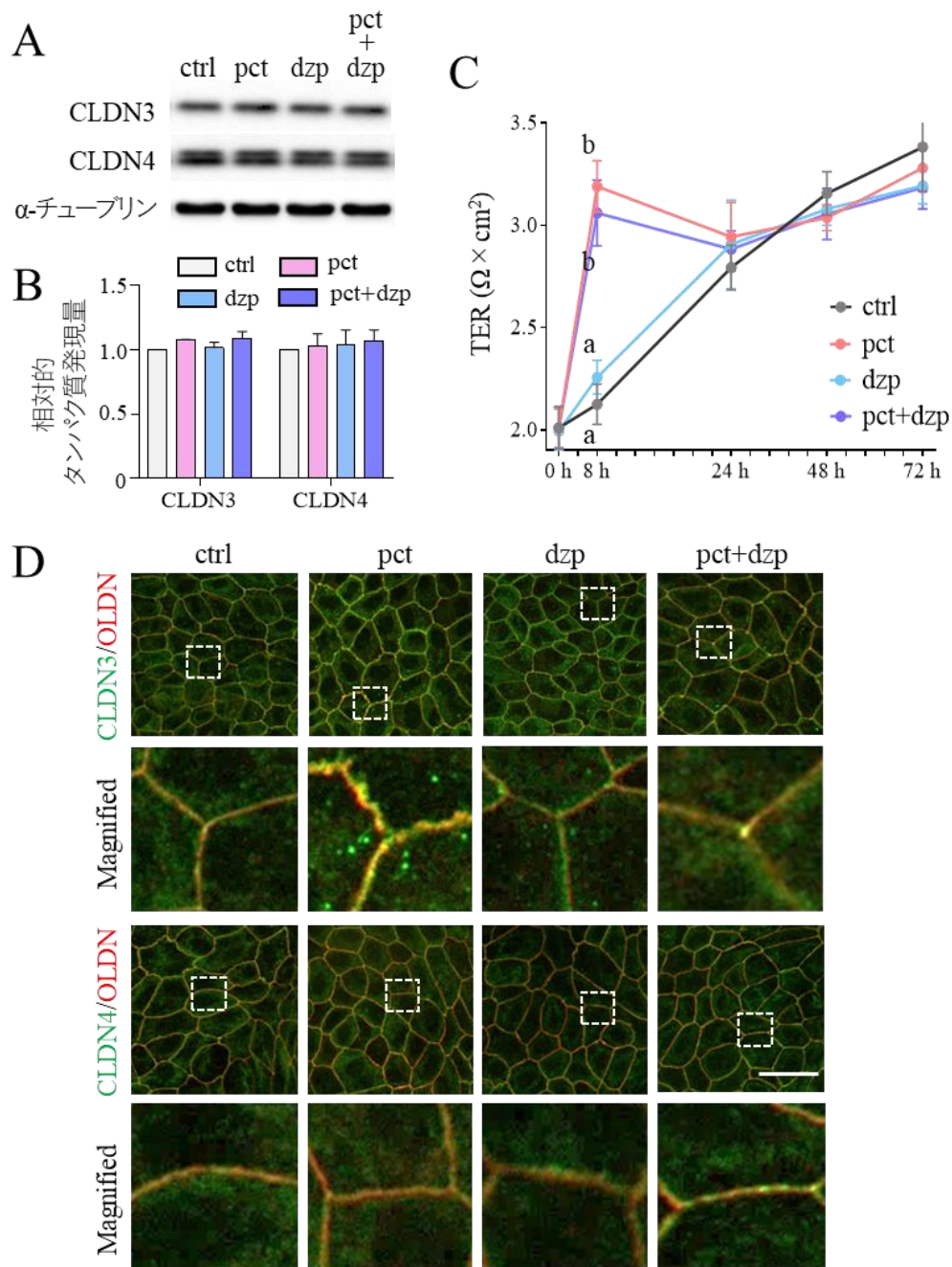


図 3-17 GABA_A 受容体の Cl⁻流入阻害剤が MEC における TJ 構成タンパク質の発現に及ぼす影響

(A, B, D) GABA_A 受容体作動薬のジアゼパム (dzp) 1 μM 、拮抗薬のフルマゼニル (fmn) 1 μM 、あるいは両方を含む分化培地で 72 時間処理した MEC における CLDN3、CLDN4、 α -チューブリンの代表的なウェスタンブロッティング像 (A)、バンドをデンストメトリー解析して α -チューブリンで標準化したタンパク質量のグラフ (B)、および免疫染色像 (CLDN3; 緑、CLDN4; 緑、OCLN; 赤)を示す。エラーバーは標準誤差、異符号間は $p < 0.05$ を示す ($n = 6$)。免疫染色像の白い四角は拡大画像の領域、スケールバーは 20 μm を示す。 (C) 1 μM fmnn、1 μM dzp、あるいは両方を含む分化培地で 72 時間処理した MEC における経上皮抵抗値 (TER)の経時的な変化を示す。エラーバーは標準誤差、異符号間は $p < 0.05$ を示す ($n = 6$)。

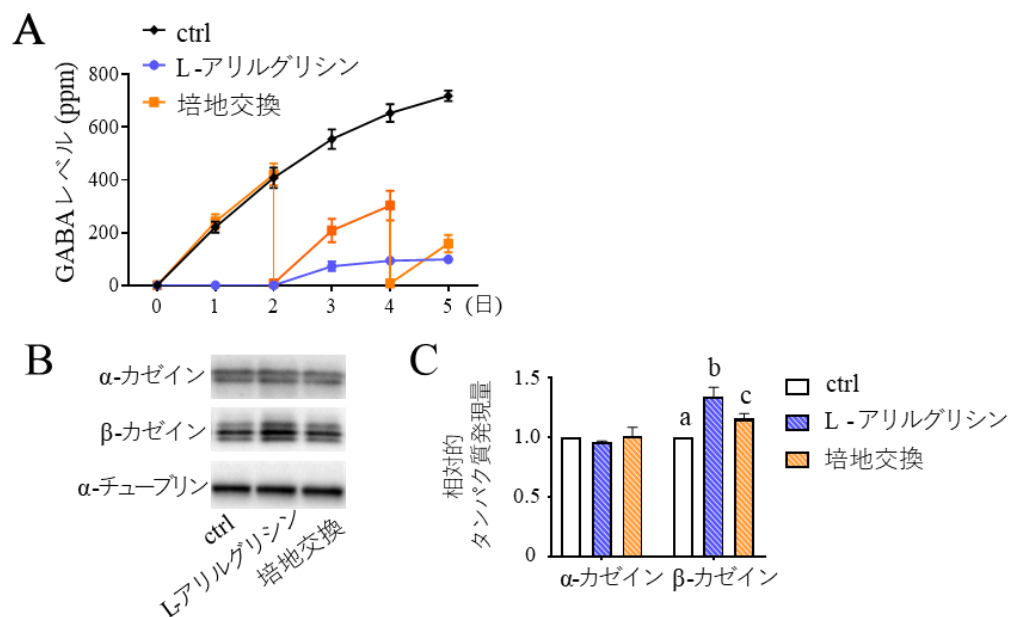


図 3-18 GABA の分泌抑制が乳産生に及ぼす影響

(A–C) Cell culture insert 上で培養した MEC のコントロール群 (黒)および GABA 合成阻害剤である L-アリルグリシン 2.5 mM 処理群 (青)の上層培地を 5 日間交換せずに培養、あるいは 2 日間に 1 度の培地交換をしながら培養した場合の培地中 GABA 濃度、MEC における細胞内 α -カゼイン、 β -カゼイン、 α -チューブリンの代表的なウェスタンブロットティング像 (B)、バンドをデンシトメトリー解析して α -チューブリンで標準化したタンパク質量のグラフ (C)を示す。エラーバーは標準誤差を示す (n=4)。 (B, C) L-アリルグリシン 0.1 mM、1 mM 存在下で 2 日間に 1 度の培地交換をしながら培養した MEC における細胞内 α -カゼイン、 β -カゼイン、 α -チューブリンの代表的なウェスタンブロットティング像。エラーバーは標準誤差、異符号間は $p < 0.05$ を示す (n=4)。

考察

GABA は神経細胞に発現する GABA_A 受容体や GABA_B 受容体に結合し、神経細胞の興奮を抑制する神経伝達物質として広く知られている (Decavel and Van den Pol, 1990)。近年の研究により、GABA が免疫系・膵島・肝臓・消化管など多様な末梢組織に存在し、それらの組織において生理調節因子として機能することが報告されている (Wan *et al.*, 2015; Bhat *et al.*, 2010; Cohen, 2002; Ali *et al.*, 2025)。また、GABA とその受容体が乳がんの発達や転移に関与することも報告されている (Bundy *et al.*, 2024; Sizemore *et al.*, 2014)。しかし、正常な乳腺組織における GABA 受容体の発現やその役割は明らかにされていない。そこで本研究では、まず MEC における GABA 産生能と GABA 受容体の発現パターンを調べた。その結果、MEC が GABA を合成・分泌すること、GABA_A 受容体を発現するが、GABA_B 受容体を発現しないことがわかった。この結果を踏まえ、GABA_A 受容体の活性化を調節する 3 種類の薬物、ジアゼパム (正のアロステリック調節により活性化を増強する作動薬)、フルマゼニル (負のアロステリック調節により活性化を増強する作動薬)、ピクロトキシン (GABA_A 受容体の Cl⁻チャンネル部位を塞ぐブロッカー)を用いた培養実験を行ったところ、GABA_A 受容体の活性化と不活性化が MEC の細胞生存性、アポトーシス、カゼイン産生、TJ バリア機能、およびそれらを制御する細胞内のシグナル分子に影響を与えることがわかった。また、乳腺組織には GABA が 200 ppm 以上含まれていること、MEC は GABA を合成・分泌すること、培養下でピクロトキシン処理した MEC では細胞 Cl⁻濃度が低下すること、短期的なジアゼパム処理が GABA_A 受容体の下流として知られる Akt と ERK の活性化を誘導することも確認された (Pakkhesal, 2024; Wang *et al.*, 2005)。さらに、ジアゼパムとフルマゼニルの併用やジアゼパムとピクロトキシンの併用をした場合、いくつかの例外はあったが、互いの作用を打ち消し合う中和反応を示した。これらの結果は、末梢組織である乳腺を構成する MEC において GABA_A 受容体が Cl⁻チャンネルとして機能し、GABA_A 受容体の活性化が乳腺における MEC の生理的調節に重要な役割を果たすことを示すものであった。以上のことから、乳腺の MEC には自律的に GABA を産生し、GABA_A 受容体を介して自らの生存性や乳産能力を

調節するオートクライン・パラクライン機構が備わっていると考えられる。

本研究において、GABA_A 受容体の活性化、不活性化、および Cl⁻ の細胞内流入の抑制はいずれも MEC のアポトーシスを誘導した。そこで細胞増殖と細胞生存性を上方調節するシグナル分子として知られている Akt と ERK の活性化状態を調べると (McCubrey *et al.*, 2007; Yu and Cui, 2016)、Akt の不活性化と ERK の活性化が同時に起きており、解釈が難しい矛盾する結果が得られた。また、アポトーシス誘導に関わるタンパク質である Bax と抗アポトーシスタンパク質である Bcl2 の発現レベルを調べると (Raisova *et al.*, 2001)、GABA_A 受容体の活性化とピクロトキシンによる Cl⁻ の GABA_A 受容体の機能阻害はどちらも BAX 減少と Bcl2 増加を引き起こしており、MEC のアポトーシスが誘導されている事実と矛盾する結果であった。同様の矛盾は先行研究においても報告されている。例えば、GABA_A 受容体の活性化が肝細胞や神経細胞のアポトーシスを抑制するが (Lan *et al.*, 2024; Rohbeck *et al.*, 2023)、一方で大腸上皮細胞や胎盤栄養膜細胞ではアポトーシスを誘導する (Ma *et al.*, 2018; Lu *et al.*, 2016)。現時点において、本研究の結果とこれらの報告でみられる矛盾の謎を紐解くことは難しいが、矛盾が生じる原因候補の一つとして、GABA_A 受容体が Cl⁻ チャンネルの一つであることが挙げられる。なぜなら、細胞内の Cl⁻ 濃度は GABA_A 受容体のみならず、CFTR、CaCC、NKCC1 などのチャンネルや輸送体によっても調節され (Sheppard and Welsh, 1999; Hoshino *et al.*, 2002; Yamada *et al.*, 2004)、GABA_A 受容体による Cl⁻ 流入には細胞内の陽イオンや陰イオンの電気化学的勾配も関わっているからである (Armstrong, 2003)。すなわち、細胞内の Cl⁻ 濃度を調節する機構が多岐にわたり複雑であるため GABA_A 受容体の活性化がもたらす影響も多様に変化し、今回の結果の様に通常とは異なる様式でアポトーシスが誘導されたのかもしれない。

本研究において、GABA_A 受容体の機能をそれぞれ異なる様式で調節する 3 種類の薬物、ジアゼパム、フルマゼニル、ピクロトキシンはいずれも β -カゼインの分泌量を減少させた。また、MEC の乳産生能力を上方調節する転写因子である STAT5 の活性化を抑制した (Kobayashi *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2013)。先行研究において、 β -カゼインの発現には STAT5

の活性化が必要不可欠であることが報告されており (Kobayashi *et al.*, 2017)、本研究において 3 種類の薬物で処理した際の結果と一致していた。これらの結果は STAT5 の活性化と β -カゼイン発現において細胞内 Cl⁻濃度が厳密に制御されている必要があることを示しており、GABA_A 受容体に作用する 3 種類の薬物によって細胞内 Cl⁻濃度の調節機構が乱れたと考えられる。しかし、3 種類の薬物が MEC の乳産生に関わる因子に異なる影響を示すことも多くあった。例えば、乳産生促進性のシグナル分子である GR はジアゼパムで GABA_A 受容体を活性化した場合にのみ活性化された。また、炎症促進性のシグナル分子である STAT3、NF κ B、p38、JNK は MEC の乳産生を下方調節することが知られているが (Yu *et al.*, 2009; Ghosh and Hayden, 2008; Herlaar and Brown, 1999; Ip and Davis, 1998)、ジアゼパムは p38 を活性化し、フルマゼニルはいずれにも作用せず、ピクロトキシンは STAT3、JNK、p38 を活性化する一方で NF κ B を不活性化した。先行研究において、GABA_A 受容体の活性化が STAT3 と NF κ B を不活性化すること (Rohbeck *et al.*, 2023)、GABA_A 受容体の不活性化が p38 と JNK を活性化することが報告されている (Shipman *et al.*, 2012; Promtang *et al.*, 2023)。これらの報告はいずれも GABA_A 受容体の活性化が炎症促進性のシグナル分子を不活性化することを示しており、本研究の結果と部分的な一致は示したが、ジアゼパムによる p38 を活性化やピクロトキシンによる NF κ B の不活性化とは矛盾した結果であった。前段落での考察と同様に、この矛盾を現時点で説明することは難しいが、少なくとも GABA_A 受容体が乳産生や炎症に深く関わっている可能性は高いと考えられる。

本研究においてピクロトキシンは処理 8 時間後の TJ バリア機能を一時的に向上させていた。一方、ジアゼパム、フルマゼニルはコントロール群との違いを示さなかった。また、ジアゼパム、フルマゼニル、ピクロトキシンの 24 時間処理した MEC においては CLDN3 および CLDN4 の発現量にほとんど変化は認められなかった。しかし、ピクロトキシンにおいては CLDN3 の局在が変化する様子が示された。すなわち、GABA_A 受容体を介した TJ への影響はピクロトキシンによる Cl⁻チャネルの阻害が起きた場合によってのみ検出されたのである。通常、TJ を構成する CLDN は上皮細胞の頭頂部近傍の細胞膜に集約して局在し、細胞間

隙に TJ ストランド構造を形成することによって傍細胞経路の密着構造を形成する (Furuse, 2010)。しかし、炎症成分に曝された上皮細胞では、CLDN の局在が頭頂部近傍の細胞膜から細胞質に移動し、その結果として TJ バリア機能が低下する場合がある (Kobayashi *et al.*, 2021)。乳房炎に罹患した乳腺においても CLDN3 の局在変化とこれらの炎症成分の活性化が報告されている (Kobayashi *et al.*, 2013)。本実験においてピクロトキシン処理した MEC では炎症性のシグナル分子である STAT3、JNK、p38 が活性化していたことから、ピクロトキシンによる GABA_A 受容体を介した TJ バリアの脆弱化は、これらの炎症性シグナルの活性化によって引き起こされた CLDN3 の局在変化が原因であると考えられる。

以上のことから、MEC は GABA を産生し、GABA_A 受容体を介して Cl⁻恒常性、乳タンパク質産生、細胞生存性、炎症応答、さらには TJ の微細構造までに影響を与える自律的な調節機構を備えていると考えられる。すなわち、本研究の成果は、乳腺における GABA シグナルの存在とその機能的意義を初めて体系的に示したものであり、今後、泌乳異常や乳腺炎など乳腺疾患の新たな調節機構の理解に大きく寄与する可能性がある。

結論

MEC が抑制性神経伝達物質である GABA を自律的に産生し、Cl⁻チャンネル型の GABA_A 受容体を介して自らの細胞内 Cl⁻濃度を調節している。MEC における GABA_A 受容体を介した細胞内 Cl⁻濃度は非常に厳密に制御されており、その制御が破綻した場合には乳腺上皮細胞の生存性や機能が著しく損なわれる

第四章 神経伝達物質シグナルの応用的解析

序文

これまでの第二章と第三章において、抑制性神経伝達物質の GABA と興奮性神経伝達物質のドーパミンがそれぞれの受容体を介して MEC の生存性や乳産生を調節することを明らかにした。これらの結果は、神経伝達物質が、従来の「神経細胞に作用して間接的に乳腺に影響を及ぼす役割」だけではなく、「MEC が自ら産生し、自らの受容体を介して自律的な調節を行うオートクライン・パラクライン機構の成分としての役割」も担っていることを示すものであった。しかし、GABA 受容体やドーパミン受容体を活性化する成分は内因性の神経伝達物質だけではない。それは、中枢神経系の神経伝達物質の受容体をターゲットとした昆虫を防除する農薬および家畜に投与する飼料添加物や薬物といった外因性成分である。

近年の農薬の多くは、昆虫の神経細胞の受容体を標的として高い殺虫活性を示す設計となっており、例として GABA 受容体をターゲットとした (プロフラニリド、フィプロニル) やニコチン性アセチルコリン受容体をターゲットとしたネオニコチノイド系の農薬などが挙げられる (Zhan *et al.*, 2021; Shao *et al.*, 2011)。本来は昆虫特異的に作用するよう設計されているが、実は哺乳類の受容体やその下流分子との部分的な交叉性があることが次々と報告され (BRAKES *et al.*, 2005; Sultatos, 1994)、農薬を散布した農地で収穫した野菜や牧草などに残存したこれらの農薬が家畜やヒトに摂取され、脂質組織などに蓄積した農薬が体内で慢性的に負的作用を引き起こすことが懸念されている。また、乳牛の分泌する生乳からも農薬が検出されることから、第三章の GABA 受容体と MEC の研究結果と合わせて考えると、MEC を介して乳牛の乳生産性にも影響することが懸念される。

神経伝達物質の受容体をターゲットした飼料添加物や薬物が家畜に投与される場合もある。例えば、第三章で調べた GABA は家畜のストレスを軽減させる飼料添加物として使用されている (Cheng *et al.*, 2016)。また、第三章で検証したドーパミン受容体である D2R の拮抗薬 (アセプロマジン、アザペロン) は家畜を鎮静させる際に用いられ (Nishimura *et al.*, 1993)、D2R 不活性化と活性化をそれぞれ誘導するドンペリドンとブロモクリプチンが生殖周

期の調整や無発情の解消に使用されたりしている。さらに、D2R 拮抗薬であるドンペリドンは脳下垂体からのプロラクチン分泌を促すことから、ウシやヒツジなどの家畜種で泌乳量の向上を目的に利用されている (Vanklompenberg *et al.*, 2013)。しかし、ドンペリドンの長期使用や高用量投与が消化管機能や内分泌バランスを乱すといった末梢組織での影響も報告されている (Tavares *et al.*, 2021)。そして第三章の結果より、D2R 受容体を介した末梢組織での影響の中には乳腺も含まれることが示された。すなわち、ドンペリドンを介した D2R 受容体の活性化抑制が泌乳期の乳腺に存在する MEC に直接作用している可能性が高いのである。しかし、妊娠期の MEC が乳腺内で行う乳腺上皮組織の発達に与える影響を調べた例はない。

以上、乳腺に存在する MEC は内因性の神経伝達物質だけではなく、神経伝達物質受容体をターゲットとした外因性成分の影響を受ける可能性がある。そこで本章では神経伝達物質の受容体をターゲットとした農薬、飼料添加物、および薬物の影響を明らかにするため、GABA 受容体を標的とする殺虫剤プロフラニリドと家畜の飼料添加物として使用される外因性の GABA が MEC の乳産生に与える影響を乳分泌を再現した培養モデルによって調べた。そして臨床・畜産分野で用いられる D2R 受容体拮抗薬であるドンペリドンが妊娠期の乳腺上皮組織の発達に与える影響については、培養下で乳管伸長、乳腺胞出芽、および乳腺胞の内腔形成を再現した三次元培養モデルを用いてそれぞれ調べた。本研究の成果により、神経伝達物質の受容体をターゲットとした農薬や薬物が末梢組織である乳腺の MEC に作用することを示し、殺虫剤として使用されるプロフラニリドと D2R 受容体拮抗薬であるドンペリドンが引き起こすリスクを分子・細胞レベルで証明することを目的とする。

結果

4.1 プロフラニリドが MEC に及ぼす影響

4.1.1 プロフラニリドが MEC の細胞増殖性と生存性に及ぼす影響

プロフラニリドが MEC の細胞増殖に与える影響を評価するため、対数増殖期にある MEC に 0–10 μM のプロフラニリドを 24 時間処理し、その細胞増殖性を調べた。その結果、0.3 μM

ブロフラニリドでは細胞増殖性に影響は認められなかったが、1 μM 以上で細胞増殖性は有意に低下し、10 μM のブロフラニリド存在下ではコントロール群の約 40%を示した (図 4-1A)。

続いて、コンフルエントに到達した MEC を 0.01–100 μM ブロフラニリドを含む分化培地で 24 時間培養し、その死細胞数の割合を調べた。死細胞の割合は濃度依存的に増加して S 字型の曲線を呈し、その 50%致死濃度 (LC_{50})は 1.602 μM と算出された (図 4-1B)。

環境暴露レベルでの潜在的な細胞毒性を評価するため、家畜の生体組織に残留する濃度 (0.02 mg/kg)を基準として(Ministry of Agriculture, 2021)、1 nM および 10 nM のブロフラニリドを含む分化培地で 24 時間培養し、MEC の形態、増殖性、およびアポトーシスに及ぼす影響を調べた。位相差顕微鏡による形態観察の結果、コントロール群では上皮組織特有の敷石状構造を呈していたが、1 nM 群では一部の細胞層に乱れが認められ、10 nM 群では敷石状層構造の乱れがより顕著であった (図 4-1C)。増殖マーカーである Ki67 の免疫染色像では、10 nM のブロフラニリド処理により Ki67 陽性細胞が減少する様子が観察され、画像解析したところ総細胞数に対する Ki67 陽性細胞数が有意に減少していた (図 4-1D, F)。また、アポトーシスマーカーである cleaved caspase-3 の免疫染色像では、cleaved caspase-3 陽性細胞はブロフラニリド処理により増加する様子が観察され、画像解析の結果、1 nM 群と 10 nM 群で段階的にアポトーシス細胞数が有意に増加していることが示された (図 4-1E, G)。

4.1.2 ブロフラニリドが MEC の細胞生存性に関わるシグナル伝達経路に及ぼす影響

ブロフラニリドによる細胞毒性の分子機序を明らかにするため、1 nM または 10 nM のブロフラニリドを 72 時間処理した泌乳期 MEC において、細胞生存に関与するシグナル分子である Akt、mTOR、ERK のリン酸化割合、およびアポトーシス関連分子である BAX と Bcl2 の発現量の変化をウェスタンブロットにより調べた。その結果、Akt のリン酸化レベルはブロフラニリドの濃度依存的に低下させるが、ERK のリン酸化レベルには影響しないことが示された (図 4-2A, B)。また、アポトーシス促進分子である BAX の発現はブロフラニリド存在下

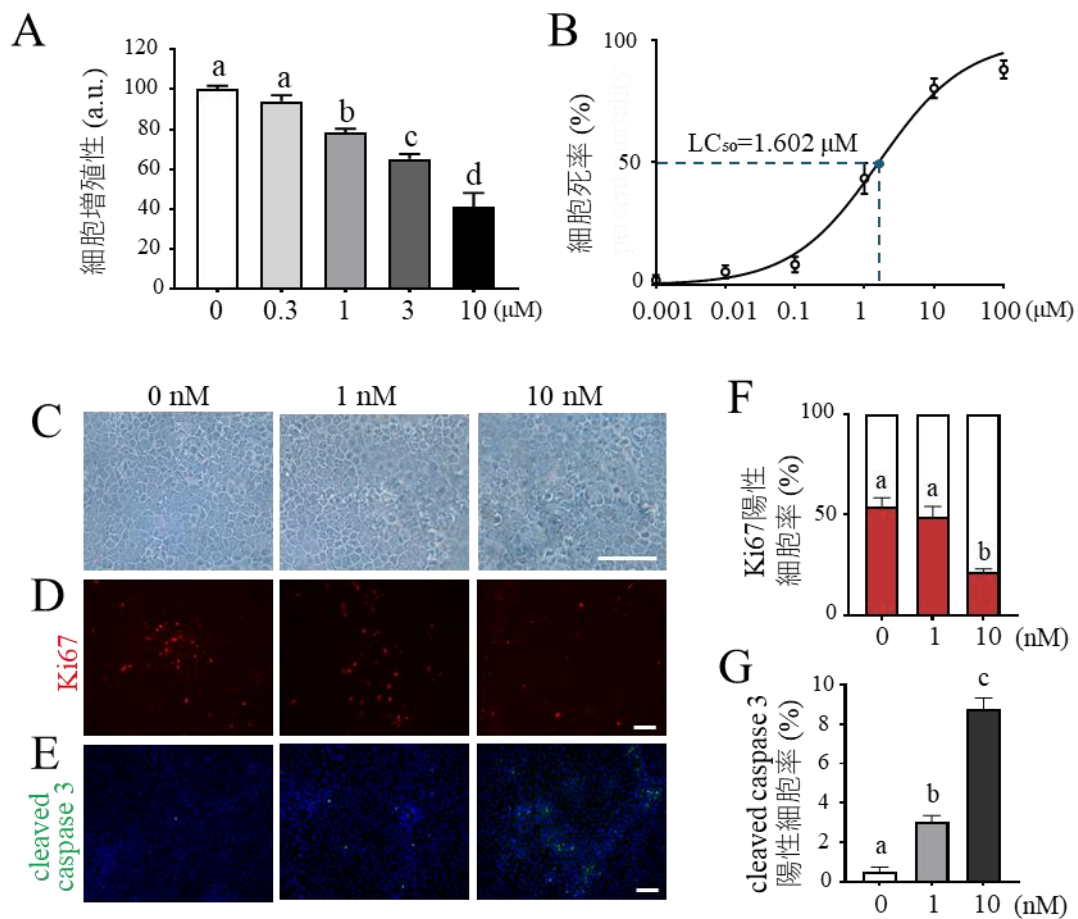


図 4-1 MEC におけるプロフラニリドの細胞毒性試験

(A) 0.3–10 μM のプロフラニリドを含む増殖培地で 24 時間培養した MEC の細胞増殖性の相対値を示す (n = 4)。 (B) 0.001–100 μM のプロフラニリドを含む分化培地で 24 時間培養したコンフルエント MEC の濃度依存的な細胞死率の曲線と算出された LC₅₀ 値を示す (n = 3)。 (C–G) 1 nM と 10 nM のプロフラニリド存在下で 24 時間培養した乳腺上皮細胞の位相差顕微鏡像 (C)、Ki67 (赤; D) と cleaved caspase-3 (緑; E) の免疫染色像、および免疫染色像でカウントされた DAPI 陽性細胞数に対する Ki67 陽性細胞数と cleaved caspase-3 陽性細胞数の割合を示す (n = 10)。スケールバーは 50 μm、エラーバーは標準誤差、異符号間は $p < 0.05$ を示す。

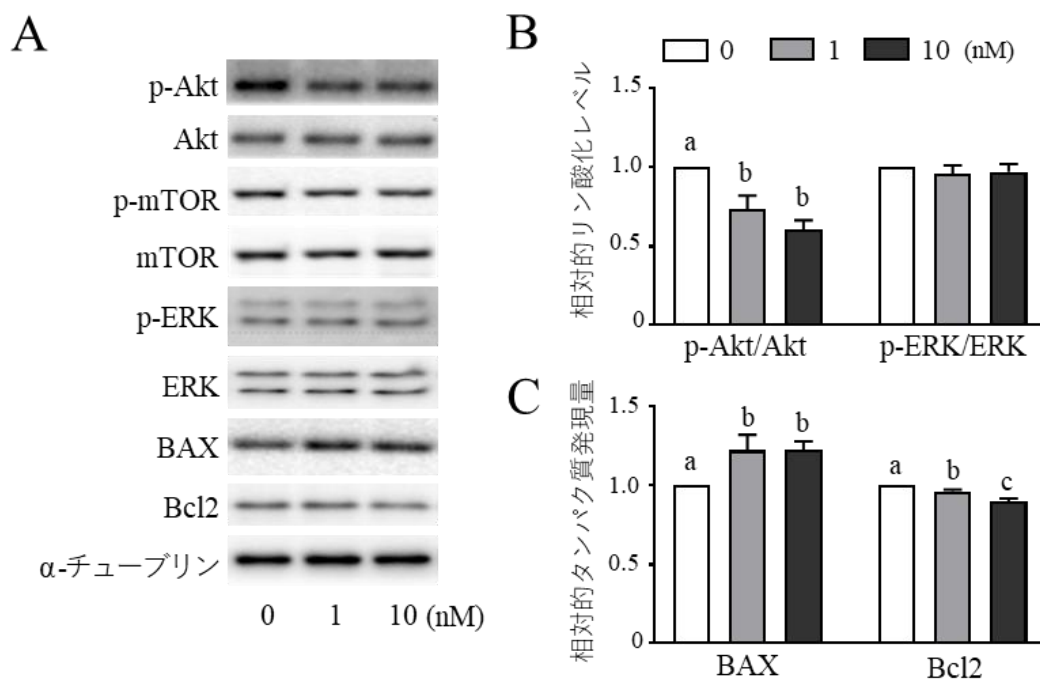


図 4-2 プロフラニリドが MEC の細胞生存性に関わるシグナル分子に及ぼす影響

(A–C) プロフラニリド 1 nM、10 nM を含む分化培地で 72 時間培養した MEC におけるリン酸化 Akt (p-Akt)、Akt、p-ERK、ERK、BAX、Bcl2、α-チューブリンの代表的なウェスタンブロットティング像 (A)、およびバンドをデンスitrometry解析して算出したリン酸化レベルあるいはα-チューブリンで標準化したタンパク質量のグラフを示す (B, C)。エラーバーは標準誤差、異符号間は $p < 0.05$ を示す ($n = 4$)。

でコントロール群よりも有意に増加し、一方でアポトーシス抑制分子である Bcl2 の発現量は減少していた (図 4-2C)。以上の結果より、ブロフラニリドが Akt 経路の不活性化を介して BAX/Bcl2 比率を低下させ、アポトーシスを誘導する可能性が示された

4.1.3 ブロフラニリドが MEC の乳タンパク質産生に及ぼす影響

ブロフラニリドが乳タンパク質産生に及ぼす影響を調べるため、MEC を 1 nM、10 nM のブロフラニリドを含む分化培地で 72 時間培養し、細胞内および培地中に分泌された α -カゼインと β -カゼインをウェスタンブロットとそのバンドのデンストメトリー解析で調べた。その結果、10 nM のブロフラニリド処理が細胞内 β -カゼイン発現量を有意に減少させること、細胞内 α -カゼイン量がブロフラニリドの濃度依存的に増加すること、一方で培地中の α -カゼイン量は濃度依存的に減少することがわかった (図 4-3A、B)。そこで α -カゼインと β -カゼインの細胞内局在を免疫染色で調べた結果、10 nM ブロフラニリド処理群において β -カゼイン陽性細胞がコントロールと比較して減少し、 α -カゼイン陽性細胞が増加する様子が観察された (図 4-3C)。

4.1.4 ブロフラニリドが MEC の泌乳に関わるシグナル伝達経路に及ぼす影響

ブロフラニリドが MEC のカゼイン産生に異常を引き起こしたことから、乳産生に関わるシグナル分子である STAT5 と GR のリン酸化レベルをウェスタンブロットにより調べた。その結果、STAT5 のリン酸化レベルはブロフラニリド処理により段階的に低下するが、一方で GR のリン酸化レベルには影響しないことが確認された (図 4-4A、B)。続いて、活性化した STAT5 が核内移行して転写因子として機能しているかを確認するため、免疫蛍光染色により p-STAT5a の核局在を調べた。その結果、コントロール群の MEC では大部分の細胞核が p-STAT5a 陽性であったが、1 nM ブロフラニリド処理群では p-STAT5a 陰性の細胞核が観察されるようになり、10 nM ブロフラニリド処理群では p-STAT5a の核内局在を示す細胞がまばらになっていた (図 4-4C)。そこで画像解析により DAPI 陽性の総細胞数に対する p-STAT5a 陽性細胞数の割合を算出すると、コントロール群では約 90% の細胞が p-STAT5a 陽性であった

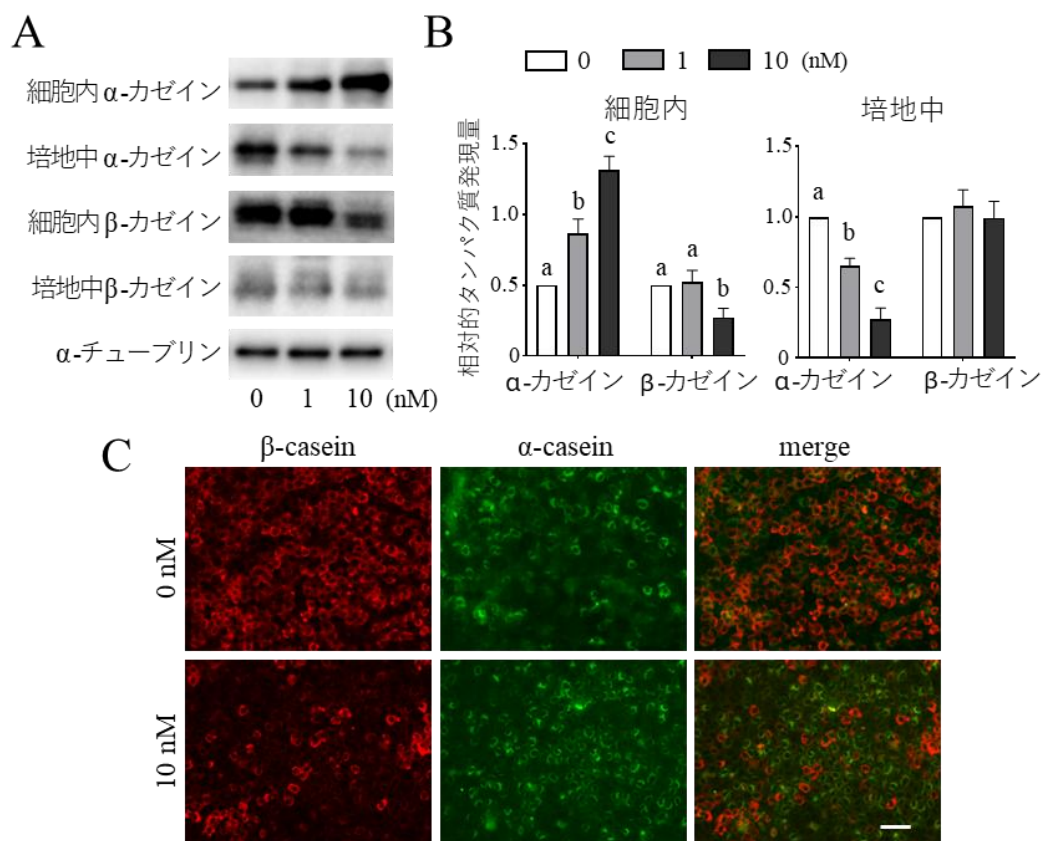


図 4-3 プロフラニリドが MEC の乳タンパク質産生に及ぼす影響

(A, B) プロフラニリド 1 nM、10 nM を含む分化培地で 72 時間培養した MEC における細胞内および分泌された α -カゼイン、 β -カゼイン、 α -チューブリンの代表的なウェスタンブロッティング像 (A)、およびバンドをデンスitrometry 解析して α -チューブリンで標準化したタンパク質量のグラフを示す (B)。エラーバーは標準誤差、異符号間には $p < 0.05$ を示す ($n = 4$)。 (C) β -カゼイン (赤)および GM130 (緑)の代表的な免疫染色像を示す。スケールバーは 25 μm を示す。

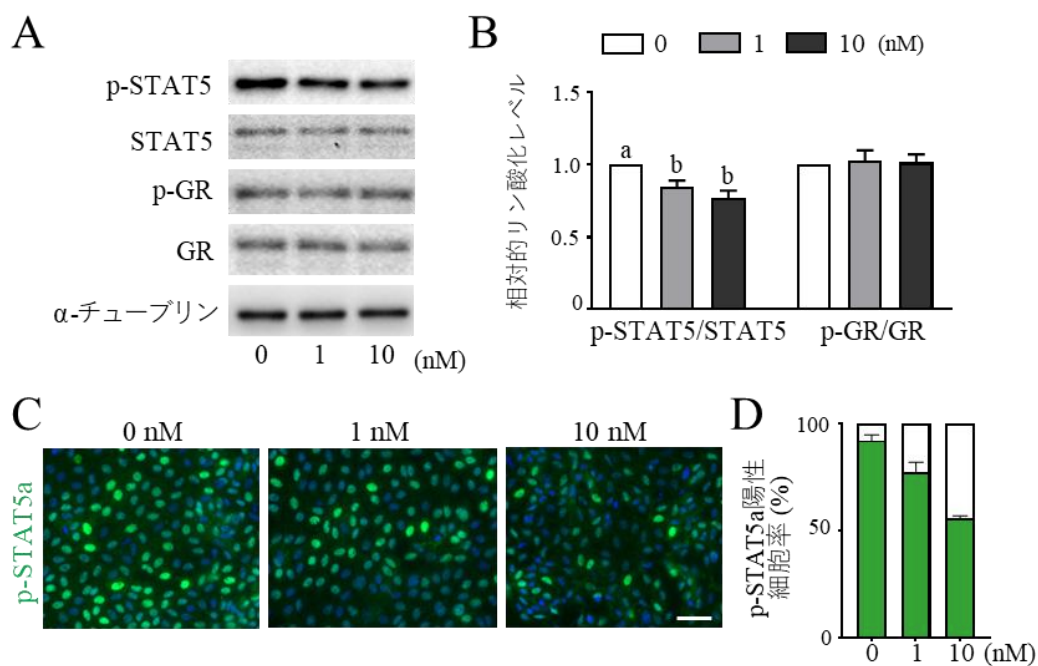


図 4-4 プロプラニリドが MEC の泌乳に関わるシグナル分子に及ぼす影響

(A, B) プロプラニリド 1 nM、10 nM を含む分化培地で 72 時間培養した MEC におけるリン酸化 STAT5 (p-STAT5)、STAT5、p-GR、GR の代表的なウェスタンブロッティング像 (A)、およびバンドをデンシトメトリー解析して算出したリン酸化レベルのグラフを示す (B)。エラーバーは標準誤差、異符号間は $p < 0.05$ を示す ($n = 4$)。 (C) p-STAT5a の代表的な免疫染色像、スケールバーは 20 μm を示す。 (D) グラフは免疫染色像でカウントされた DAPI 陽性細胞数に対する p-STAT5a の陽性細胞数の割合を示す。 ($n = 97-102$)

が、1 nM と 10 nM のブロフラニリド処理群ではそれぞれ 80%弱、60%弱に低下していた (図 4-4D)。

4.1.5 ブロフラニリドが MEC の炎症に関するシグナル伝達経路に及ぼす影響

続いて、炎症関連のシグナル分子である STAT3、NFκB、p38、JNK に対するブロフラニリドの作用を調べるため、MEC を 1 nM または 10 nM のブロフラニリドを含む分化培地で 72 時間処理し、そのリン酸化レベルの変化をウェスタンブロットにより調べた。その結果、STAT3、p38、JNK のリン酸化レベルはブロフラニリドの濃度依存的に減少するが、NFκB のリン酸化レベルは有意に増加することがわかった (図 4-5A–C)。

4.2 外因性 GABA が MEC の生存性と乳産生に及ぼす影響

GABA は体内で産生される内因性成分であるが、近年はヒトや家畜のストレス軽減を目的としたサプリメント成分としても利用されている。しかし、過剰に摂取した外因性の GABA が MEC に及ぼす影響はわかっていない。そこで GABA による MEC の生存性への影響を調べるため、0.01–100 mM の濃度で MEC を 48 時間培養し、その細胞生存性を調べた。その結果、0.01–1 mM の細胞生存性にコントロール群との有意差はみられなかったが、3–100 mM の高濃度では濃度依存的な細胞生存性の低下が認められた (図 4-6)。

続いて、外因性 GABA が MEC のカゼイン産生に及ぼす影響を調べるため、乳分泌誘導した MEC を生理的濃度あるいは非生理的な高濃度の GABA 存在下で 72 時間培養し、細胞内および培地中に分泌された α-カゼインと β-カゼインをウェスタンブロットとそのバンドのデンストメトリー解析で調べた。まず、内因性 GABA による生体濃度に相当する生理的濃度である 0.2–2 μM の GABA 存在下で培養した場合、細胞内および培地中の α-カゼイン、β-カゼイン量に変化は認められなかった (図 4-7A, B)。続いて、外因性 GABA の推奨摂取量を目安にした非生理的な高濃度である 0.1–1 mM で調べたが、細胞内および培地中の α-カゼイン、β-カゼイン量に変化は認められなかった (図 4-7C, D)。

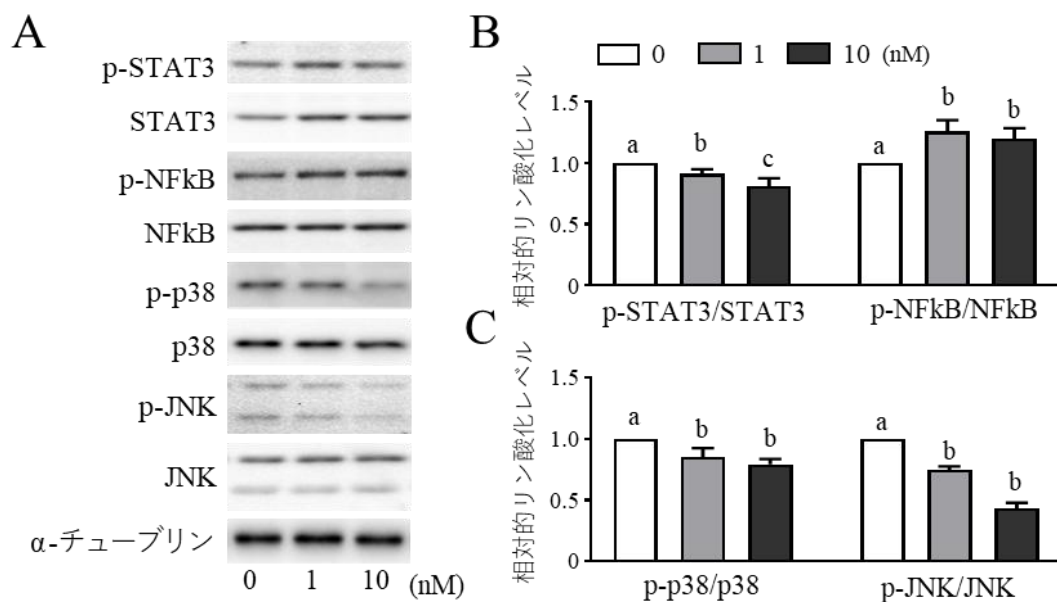


図 4-5 プロフラニリドが MEC の炎症に関わるシグナル分子に及ぼす影響

(A-C) プロフラニリド 1 nM、10 nM を含む分化培地で 24 時間培養した MEC におけるリン酸化 STAT3 (p-STAT3、STAT3、p-NFκB、NFκB、p-p38、p38、p-JNK、JNK、α-チューブリン) の代表的なウェスタンブロットティング像 (A)、およびバンドをデンシトメトリー解析して算出したリン酸化レベルのグラフを示す (B, C)。エラーバーは標準誤差、異符号間は $p < 0.05$ を示す ($n = 4$)。

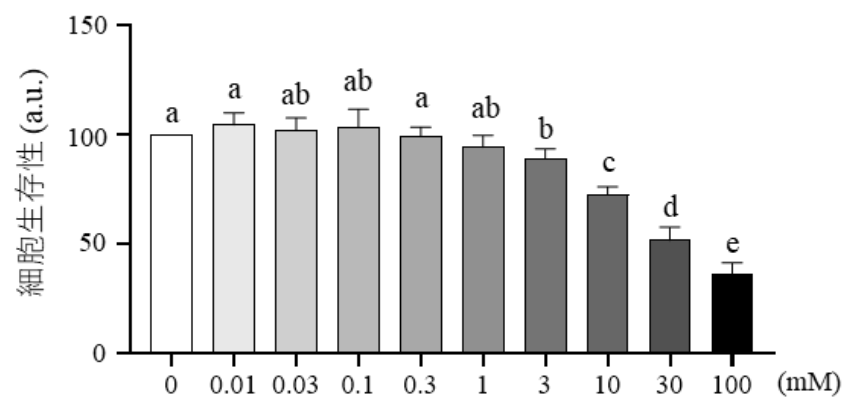


図 4-6 GABA の細胞毒性試験

0.1–100 mM の GABA 存在下で 48 時間培養した MEC の細胞生存性を示す。エラーバーは標準誤差、異符号間は $p < 0.05$ を示す ($n = 3$)。

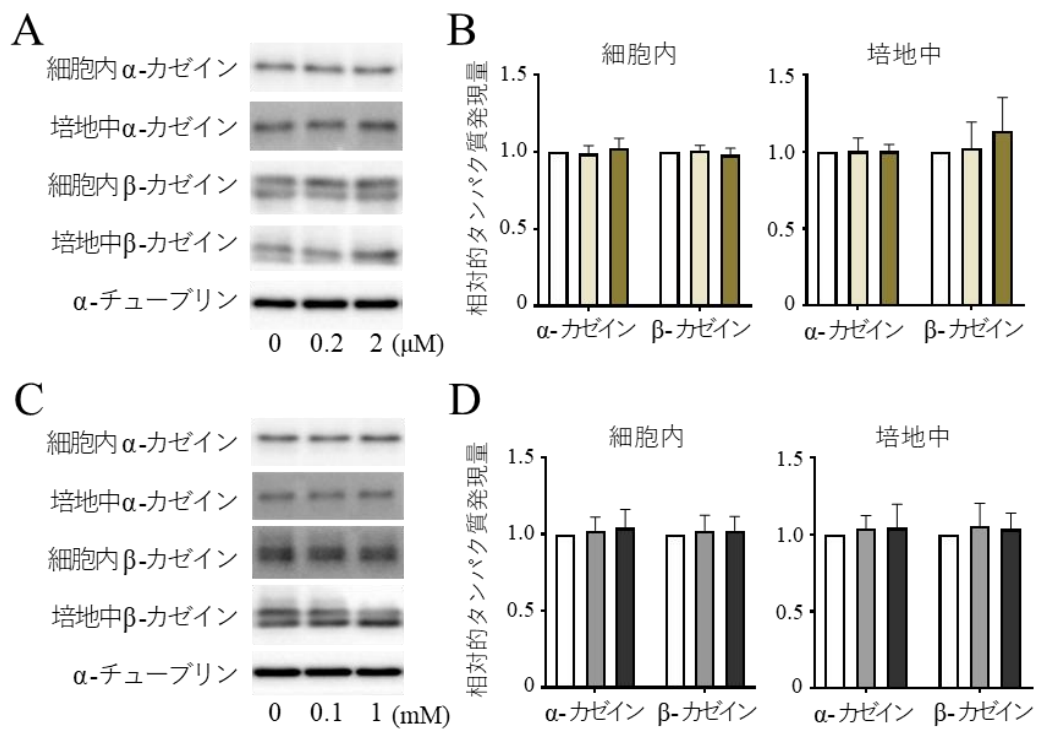


図 4-7 外因性の GABA が MEC の乳タンパク質産生に及ぼす影響

(A–D) GABA の生理濃度域である 0.2 μ M、2 μ M、非生理濃度域である 0.1 mM、1 mM を含む分化培地で 72 時間培養した MEC における細胞内および培地中に分泌された α -カゼイン、 β -カゼイン、 α -チューブリンの代表的なウェスタンブロットティング像 (A, C)、およびバンドをデンストメトリー解析して α -チューブリンで標準化したタンパク質量のグラフを示す (B, D)。エラーバーは標準誤差を示す (n = 4)。

これらの結果より、外因性 GABA の過剰摂取は MEC の生存性を低下させる可能性があるが、推奨摂取量で到達する濃度域においては MEC の生存性やカゼイン産生に影響を及ぼさないと考えられる。

4.3 ドーパミン D2R 拮抗薬ドンペリドンが MEC による乳腺上皮組織発達に及ぼす影響

妊娠期の乳腺上皮組織は、乳管の伸長、乳腺胞の出芽、乳腺胞の内腔構造形成といった段階的な発生プロセスを経て発達する。また、この構造発達の過程で MEC は増加し、乳汁産生と排出に必要な構造と機能を獲得することによって、分娩後に十分量の乳分泌が可能となる。D2R 拮抗薬であるドンペリドンは乳分泌を促す薬物として利用されているが、妊娠期の乳腺上皮組織の発達に及ぼす影響はまだ不明である。そこで本研究では、乳腺上皮組織による乳管の伸長、乳腺胞の出芽、乳腺胞の内腔構造形成を MEC のオルガノイドを用いた三次元培養によって再現し、ドンペリドンが乳腺上皮組織発達の各過程に与える影響を調べた。

4.3.1 ドンペリドンが培養下で乳腺オルガノイドの乳管伸長に及ぼす影響

ドンペリドン 5 μ M を含む乳管伸長誘導培地で乳腺オルガノイドを 3 日間培養し、乳管が伸長する様子を位相差顕微鏡で観察したところ、コントロール群では培養日数の経過に従って乳管様の構造を伸長させるオルガノイドが観察されたが、ドンペリドン処理群では乳管様構造を伸長させるオルガノイドが少ない様子であった (図 4-8A)。そこで画像解析により乳管様構造の長さを測定量したところ、培養 1 日後と 2 日後では統計的な有意差は認められなかったが、培養 3 日後にはドンペリドン処理群でコントロール群よりも有意な伸長阻害が認められた (図 4-8B)。

続いて、乳腺上皮構造の発達に寄与するシグナル分子である Akt と ERK に着目し (Biswas *et al.*, 2022; Hutchinson *et al.*, 2001)、それらのリン酸化量、総量、およびリン酸化割合をウェスタンブロットにより調べた。Akt のリン酸化量、総量、およびリン酸化割合はコントロール群とドンペリドン処理群で同レベルであった (図 4-8C, D)。また、ERK の総量も変化していなかった。しかし、p-ERK と p-ERK/ERK はドンペリドン処理によって有意に低下し (図 4-8C, D)、ドンペリドンによる ERK 経路の抑制が乳管伸長阻害に寄与していることが示唆された。

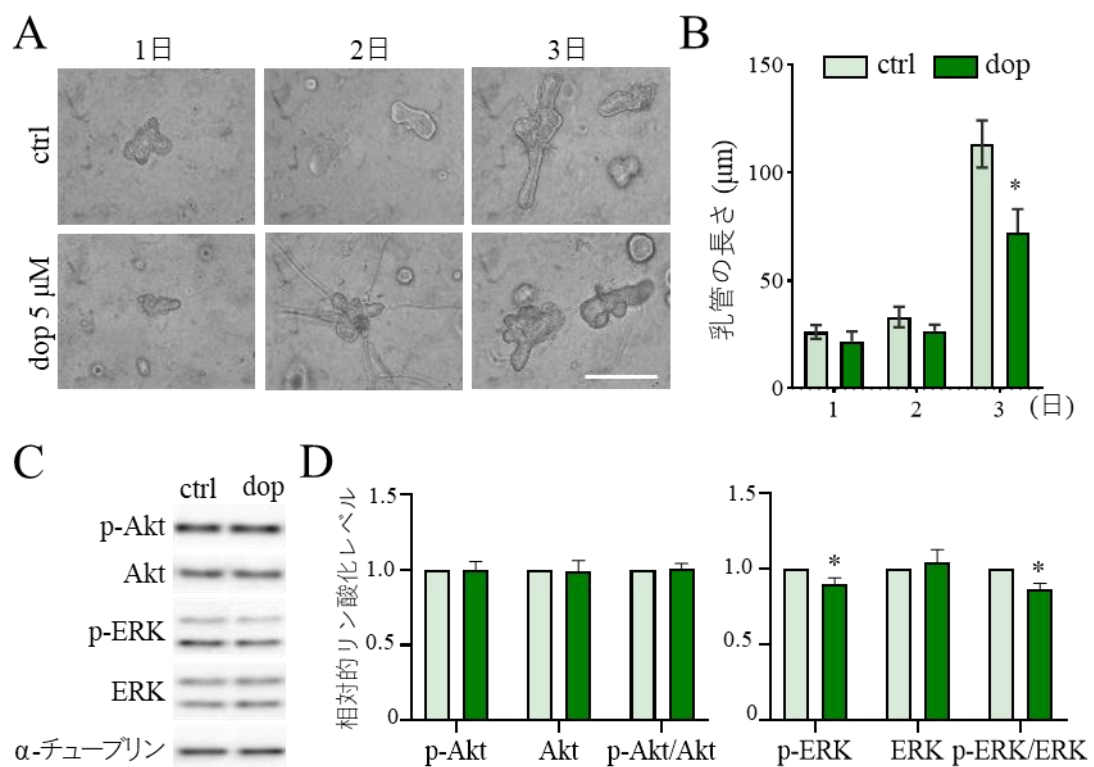


図 4-8 ドンペリドンが三次元培養モデルの乳管伸長に及ぼす影響

(A–D)ドンペリドン 5 μ M を含む乳管伸長誘導培地で3日間培養した乳腺オルガノイドの位相差顕微鏡像 (A)、その画像解析により算出したオルガノイド乳管の長さのグラフ (B)、培養3日後に回収したオルガノイドにおける p-Akt、Akt、p-ERK、ERK、 α -チューブリンの代表的なウェスタンブロッティング像 (C)、およびバンドをデンストメトリー解析して算出したリン酸化レベルのグラフを示す (D)。エラーバーは標準誤差、アスタリスクは $p < 0.05$ を示す ($n = 3$)。

4.3.2 ドンペリドンが培養下で乳腺オルガノイドの乳腺胞出芽に及ぼす影響

乳腺胞出芽誘導培地で乳腺オルガノイドを5日間培養し、乳腺胞様の構造が出芽する様子を位相差顕微鏡で観察したところ、培養1日後には出芽構造の形成が始まり、その構造は培養日数の経過にともなって増加する様子であった (図 4-9A)。また、5 μ M ドンペリドン存在下で培養した場合、培養1日後の段階ではコントロール群と同様の構造で観察されたが、培養日数の経過にしたがってオルガノイドから出芽する構造は増加し、培養5日後には出芽構造によってオルガノイドが埋め尽くされていた。位相差顕微鏡像の画像解析によりオルガノイドあたりの出芽構造数をカウントすると、ドンペリドン処理群では培養3日後にはコントロール群よりも有意に増加していること、培養5日後にはコントロール群の3倍弱に増加していることがわかった (図 4-9B)。

続いて、乳腺上皮構造発達を促す細胞内シグナルへの影響を評価するため、p-Akt、Akt、p-ERK、ERK の発現量およびそれらのリン酸化比率をウェスタンブロットで調べた。その結果、ドンペリドン処理群ではコントロール群と比べて Akt、p-ERK、ERK のリン酸化比率が上昇し、ERK 量が減少していた (図 4-9C, D)。乳腺胞が出芽する環境下では、乳管伸長過程とは異なり、ERK 経路が活性化し、Akt 経路にも限定的に影響することがわかった。

4.3.3 ドンペリドンが培養下で乳腺オルガノイドの乳腺胞内腔形成に及ぼす影響

内腔形成誘導培地で乳腺オルガノイドを3日間培養し、オルガノイド内部に乳腺胞様の内腔構造が形成される様子を位相差顕微鏡で観察したところ、コントロール群およびドンペリドン処理群のいずれにおいても内腔構造が拡大し、培養3日後には高い円形度を保った成熟した内腔構造が形成されていた (図 4-10A)。画像解析によりオルガノイドの断面積を測定した結果、培養2日後から3日後の期間に内腔構造の拡大とともに断面積の上昇が急速に進むが、ドンペリドン処理はオルガノイドの断面積に影響を与えないことがわかった (図 4-10B)。

続いて、乳腺上皮構造の発達に寄与するシグナル分子である Akt と ERK に着目し (Biswas *et al.*, 2022; Hutchinson *et al.*, 2001)、それらのリン酸化量、総量、およびリン酸化割合をウェ

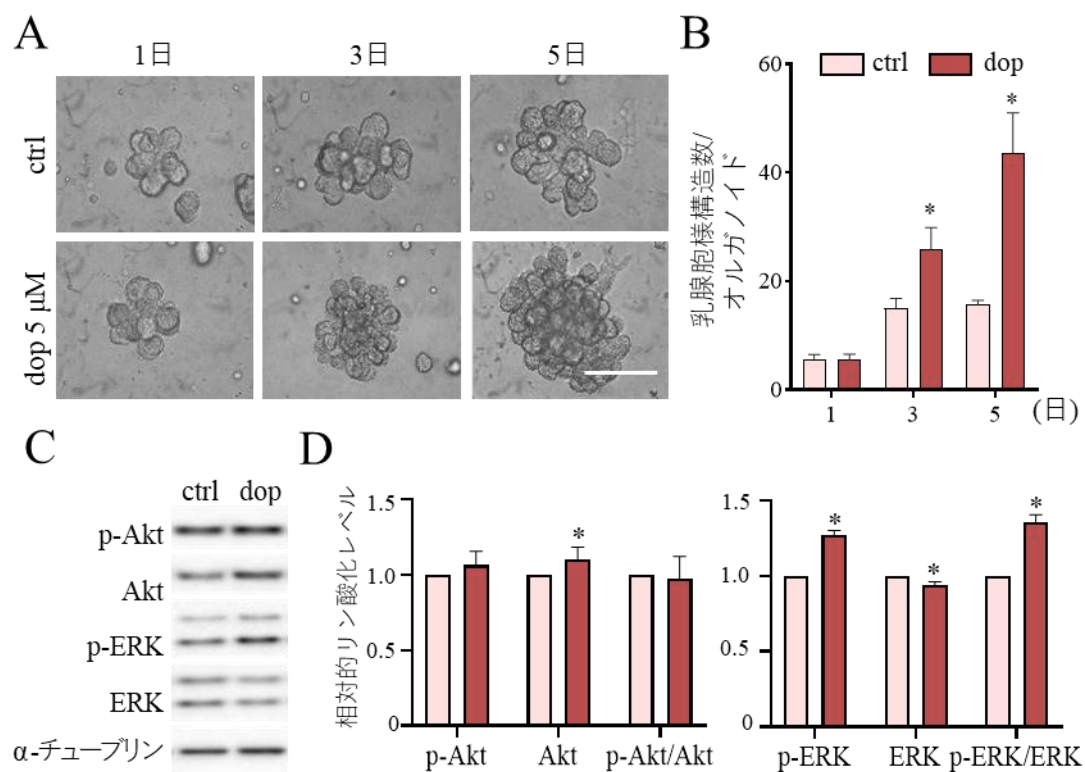


図 9 ドンペリドンが三次元培養モデルの乳腺細胞出芽に及ぼす影響

(A–D)ドンペリドン 5 μ M を含む乳腺細胞出芽誘導培地で 5 日間培養した乳腺オルガノイドの位相差顕微鏡像 (A)、その画像解析により算出したオルガノイドあたりの乳腺胞様構造数のグラフ (B)、培養 5 日後に回収したオルガノイドにおける p-Akt、Akt、p-ERK、ERK、 α -チューブリンの代表的なウェスタンブロットティング像 (C)、およびバンドをデンストメトリー解析して算出したリン酸化レベルのグラフを示す (D)。スケールバーは 100 μ m、エラーバーは標準誤差、アスタリスクは $p < 0.05$ を示す ($n = 3$)。

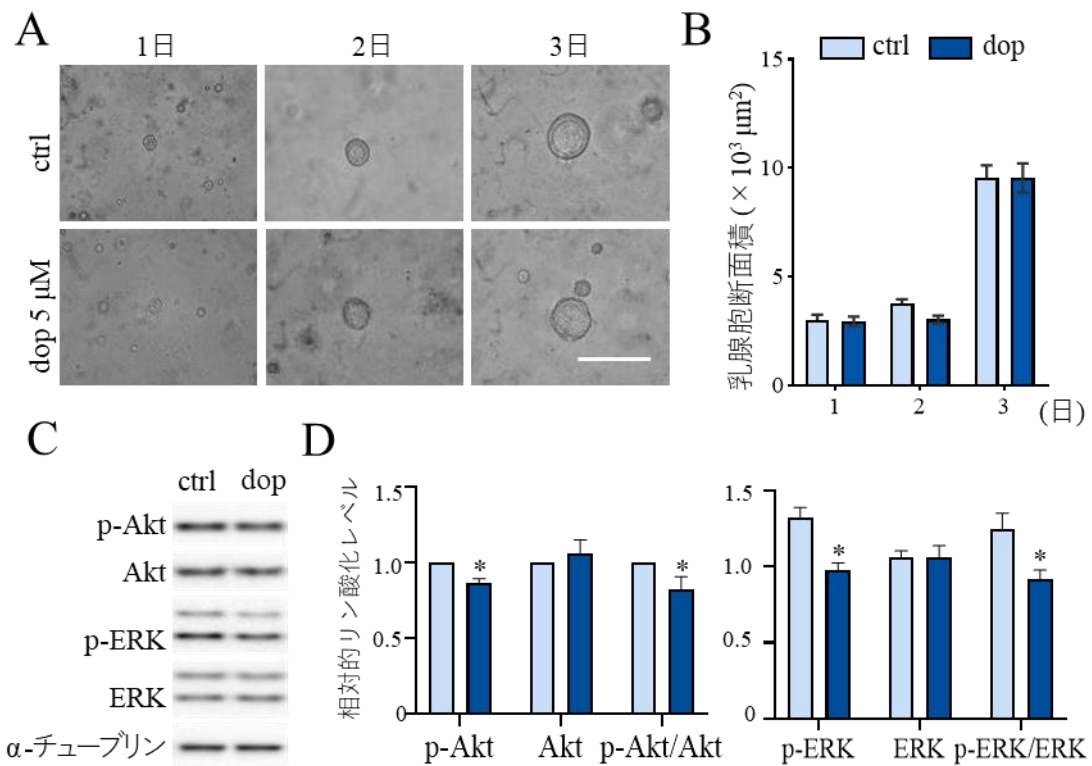


図 4-10 ドンペリドンが三次元培養モデルの乳腺胞内腔形成に及ぼす影響

(A–D)ドンペリドン 5 μ M を含む内腔形成誘導培地で3日間培養した乳腺オルガノイドの位相差顕微鏡像 (A)、その画像解析により算出した乳腺胞様オルガノイドの断面積のグラフ (B)、培養3日後に回収したオルガノイドにおける p-Akt、Akt、p-ERK、ERK、 α -チューブリンの代表的なウェスタンブロットティング像 (C)、およびバンドをデンストメトリー解析して算出したリン酸化レベルのグラフを示す。スケールバーは 100 μ m、エラーバーは標準誤差、アスタリスクは $p < 0.05$ を示す ($n = 3$)。

スタンブロットにより調べた。その結果、ドンペリドン処理により p-Akt と p-ERK の発現量が減少し、それらのリン酸化割合も低下していた (図 4-10C, D)。以上のことより、ドンペリドンは乳管の伸長、乳腺胞の出芽、乳腺胞の内腔構造形成に異なる様式で影響を与えることが示唆された。

考察

昆虫を防除する農薬、家畜への飼料添加物、および家畜に投与する薬物の中には、中枢神経系の神経伝達物質の受容体をターゲットとした外因性成分がある (Richardson *et al.*, 2019)。また、本論文の第二章と第三章において、非神経系組織である乳腺の MEC にドーパミンと GABA を合成する能力が備わっており、それらの受容体が MEC の細胞生存性や乳産生を調節することが示された。そこで本章では神経伝達物質の受容体をターゲットとした外因性成分が MEC に影響を及ぼすかを明らかにするため、GABA 受容体を標的とする殺虫剤プロフラニリドと家畜の飼料添加物として使用される外因性の GABA が MEC の乳産生に与える影響を調べ、家畜にも投与される薬物である D2R 受容体拮抗薬であるドンペリドンが妊娠期の乳腺上皮組織発達に与える影響をそれぞれ調べた。その結果、プロフラニリドが MEC の乳産生や生存性に負の影響を及ぼすこと、外因性 GABA は MEC にほとんど作用しないこと、ドンペリドンが乳腺上皮組織の発達を時期特異的に乱すことがわかった。

プロフラニリドが乳産生に及ぼす影響

先行研究において、プロフラニリドはアポトーシス関連遺伝子の発現を上昇させ、ゼブラフィッシュにおいてアポトーシスを誘導することが報告されている (Wang *et al.*, 2023; Duan *et al.*, 2021)。本研究においてもプロフラニリド処理により MEC の増殖は濃度依存的に低下し、50%細胞死レベル (LC₅₀) は 1.602 μ M であった。しかし、哺乳類組織に蓄積するプロフラニリドはナノモル濃度である (Ministry of Agriculture, 2021)。そこで哺乳類組織への蓄積量から算出したナノモル濃度でのプロフラニリドの影響も調べたところ、この低濃度域におい

ても細胞の形態異常やアポトーシス細胞の増加が引き起こされ、細胞の増殖性と生存性を制御するシグナル分子である Akt および mTOR の不活性化 (Yu and Cui, 2016; Sun *et al.*, 2015)、アポトーシス促進タンパク質 BAX の増加、および抗アポトーシスタンパク質 Bcl-2 の減少も確認された (McDonnell *et al.*, 1996)。MEC の総数は乳量を決定する要因の一つであると報告されている (Boutinaud *et al.*, 2004)。本研究においてプロフラニリドが増殖抑制とアポトーシス誘導の両機序を介して MEC の細胞数を減少させることが確認されたことから、プロフラニリドには MEC 数の減少を通じて乳腺の乳生産量を低下させるリスクがあると考えられる。

泌乳期の MEC において、 α -、 β -カゼインは粗面小胞体上のリボソームで合成され、ゴルジ体でミセルを形成する (Truchet *et al.*, 2014)。その後、ミセルは分泌小胞を介したエキソサイトーシスにより細胞外へと分泌される (Dylewski and Keenan, 1983)。特に α -カゼインはミセル形成初期および分泌経路の輸送過程で重要な役割を果たすことが知られている (Le Parc *et al.*, 2010)。本研究では、プロフラニリド処理により β -カゼインの分泌量が有意に減少する一方で細胞内 α -カゼイン量は増加した。また、泌乳誘導を担う転写因子である STAT5 のリン酸化および核内移行が有意に抑制された (Hennighausen and Robinson, 2008)。さらに、 β -カゼインの合成を正に制御する Akt/mTOR 経路はプロフラニリドによって不活性化していた (Liu *et al.*, 2020; Castro *et al.*, 2016)。一方、カゼイン分泌経路の構築を制御するシグナル分子である GR の活性化には影響がなかった (Kobayashi *et al.*, 2017)。以上より、プロフラニリドは STAT5 経路と Akt/mTOR 経路の不活性化を介して α -カゼインと β -カゼインの発現量のバランスを乱し、カゼインミセル形成にも影響を引き起こすと考えられる。

GABA_A 受容体シグナルは、 β 細胞、幹細胞、がん細胞など多様な細胞種において増殖制御に関与することが報告されている (Untereiner *et al.*, 2019; Andäng *et al.*, 2008; Takehara *et al.*, 2007)。また、GABA_A 受容体の活性化が Akt 経路を介した神経保護作用を示すこともある (Xu *et al.*, 2008)。さらに、GABA は免疫応答の重要な調節因子であり、GABA_A 受容体の活性化は NF κ B シグナルを抑制することで炎症を軽減する (Deng *et al.*, 2024; Bhandage and

Barragan, 2021)。プロフラニリドは強力な GABA_A 受容体拮抗薬であり、細胞周期停止およびアポトーシス誘導、MMP 発現低下、ROS 増加を介して炎症反応を促進することが示されている (Sung *et al.*, 2023)。本研究の MEC においてもプロフラニリドは細胞増殖と Akt/mTOR シグナルを抑制し、炎症性の転写調節因子である NFκB 活性化を増強することが確認された。しかし、プロフラニリドが STAT3 や p38 などの炎症関連のシグナル分子の活性化を抑制することがわかった (Chapman *et al.*, 2000; Whyte *et al.*, 2009; Wen *et al.*, 2011; Girnius *et al.*, 2018)、さらに、STAT5 活性化および核移行を阻害する結果も得られた。先行研究において、プロフラニリドの抗炎症作用や GABA_A 受容体シグナルと STAT5 の直接的なクロストークに関する報告はない。したがって、プロフラニリドの作用機構を明らかにするため、今後さらなる詳細な解析が必要であると考えられる。

以上、プロフラニリドは低濃度であっても MEC の増殖、生存、カゼイン産生に対して負の作用を示すことがわかった。さらに、プロフラニリドは細胞増殖と乳生産を正に制御する Akt/mTOR および STAT5 経路を抑制し、炎症性のシグナル経路である NFκB 経路が活性化する一方で STAT3 経路や p38 経路は不活性化していた。すなわち、プロフラニリドの作用は細胞内シグナル伝達経路を介して調節されている。プロフラニリドは殺虫剤として牧草地や畑に散布されている。食肉や牛乳からプロフラニリドが検出された報告を踏まえると (Ministry of Agriculture, 2021)、乳腺の健康および乳生産への潜在的リスクは高いと考えられ、今後のさらなる研究が必要である。

外因性 GABA

GABA を摂取した暑熱ストレス下の乳牛では、熱中症によるストレスを軽減し、飼料摂取量と乳量が増加し、乳質が改善することが報告されている (Cheng *et al.*, 2014)。また、成長期の子羊に GABA を給餌すると、消化管のコレシストキニン関連遺伝子を下方調節し、飼料摂取量を増加させる効果も報告されている (Wang *et al.*, 2015)。ブタや家禽にも GABA を給餌することがあり、幅広い家畜種に飼料添加物として利用されている。しかし、GABA が直接的

に乳腺の MEC に作用するかは不明である。そこで本研究では、家畜の飼料添加物として利用される外因性 GABA が乳腺上皮細胞の乳産生機能に及ぼす影響について検証した。その結果、生理的濃度 (0.2–2 μM) に相当する GABA を処理しても乳タンパク質産生量には変化が認められず、MEC の乳産生能は維持されており、一般的に飼料添加物として与えている量の GABA では直接的に MEC の乳成分産生を促進・抑制する可能性が低いことがわかった。一方、10–100 mM といった高濃度の GABA 存在下で培養した場合、MEC の生存性が濃度依存的に低下した。以上の結果から、飼料添加物としての一般的な濃度域での GABA 摂取は、乳腺上皮細胞の乳産生機能に直接的な負の影響は及ぼさないと考えられる。しかし、ヒトでの研究であるが、GABA のサプリメントとしての摂取が一時的かつ中等度の血圧低下を引き起こし、内分泌系に影響を及ぼす可能性があることが指摘されている (Oketch-Rabah *et al.*, 2021)。したがって、過剰投与や特殊な飼育条件により GABA が高濃度で乳腺組織に到達した場合、MEC の生存性低下や乳産生阻害を引き起こす可能性は否定できない。本研究で得られた知見は、家畜生産現場における GABA 添加の用量設定や長期投与の安全性評価に重要な基礎情報を提供するものであり、今後は *in vivo* における血中 GABA 上昇量の定量化や乳腺への移行性、ならびに慢性的投与による乳質・乳量への影響の検証が求められる。

ドンペリドンの泌乳促進作用と乳腺発達への影響

ドンペリドンは代表的な乳分泌促進薬であり、母体および乳児への毒性リスクが低く、安全性が高い薬剤として広く使用されている (Forinash *et al.*, 2012; Champion, 2006)。ドンペリドンはドーパミン受容体である D2R の拮抗薬であり、妊娠後期にドンペリドンを投与すると乳腺上皮細胞の分化が促進され、乳汁産生が増加することが示されている (Vanklompenberg *et al.*, 2013)。一方、妊娠期を通してプロラクチンを追加投与しても乳量は増加しないことも報告されており、これはプロラクチンが既に血液中に十分に分泌されているためと考えられている (Caron *et al.*, 2020)。第三章において、プロラクチンが十分に含まれている培養実験においてもドンペリドンが MEC の乳産生に直接的な影響がないことがわかった。しかし、

D2R が妊娠期における乳腺上皮組織の発達に及ぼす影響は不明である。妊娠期における乳腺上皮組織の発達は乳管伸長、乳腺胞出芽、乳腺胞内腔形成の3段階に大別される。そこで本章では、乳腺オルガノイドの三次元培養モデルを用いて、ドンペリドンがこれらの乳腺上皮組織発達の各段階に及ぼす影響を調べた。その結果、ドンペリドンは乳管の伸長は抑制するが、乳腺胞の出芽は促進し、乳腺胞内腔の形成には影響しないことがわかった。乳腺上皮組織の発達に密接に関与することが示された。乳腺における D2R 発現が妊娠の進行に伴い増加することが報告されている (Farmer and Palin, 2021)。また、乳管が伸長する時期は妊娠初期から中期、乳腺胞出芽が起きる時期は妊娠後期、乳腺胞内腔が形成される時期は妊娠末期である (Macias and Hinck, 2012)。したがって、D2R 拮抗薬であるドンペリドンが乳腺上皮組織の形態形成の各段階で異なる影響を示したことは、この妊娠期の D2R 発現量の変化と因果関係があるのかも知れない。

乳腺上皮組織の乳管伸長と乳腺胞出芽の過程において MEC の細胞移動と細胞増殖が必須であり、細胞内シグナル分子である Akt と ERK がその制御に貢献している (Scaltriti and Baselga, 2006; Manning and Cantley, 2007)。そこでドンペリドン処理した各培養モデルにおける Akt と ERK の活性化レベルを調べた。その結果、乳管の長さが有意に短縮した乳管伸長モデルにおいては、ERK 活性化の低下が認められた。また、乳腺胞出芽モデルにおいてはオルガノイドあたりの出芽構造数が顕著に増加とともに、Akt と ERK の活性化が増強していた。一方、細胞移動や細胞増殖を必要としない乳腺胞内腔形成においては、Akt と ERK が不活性化しているにも関わらず、ドンペリドンの影響は認められなかった。以上を総合すると、ドンペリドンは ERK および Akt シグナルの不活性化と活性化を介して細胞増殖と細胞移動を制御し、乳管伸長を抑制しつつ、乳腺胞出芽を促進し、内腔形成には大きな影響を及ぼさないという特徴的な作用を示す薬物であると考えられる。今後、D2R の発現パターンと乳管上皮組織の発達を精査することにより、D2R の生理的な役割とドンペリドンの適切な用法・用量が明らかになることが期待される。

結論

本研究は、乳腺上皮細胞が神経伝達物質シグナルに対して高度に感受性を有する非神経性標的組織であることを示すとともに、神経伝達物質受容体を標的とする外因性化学物質が、乳腺の発達・恒常性・乳生産機能に予期せぬ影響を及ぼし得ることを明らかにした。本研究で得られた知見は、家畜生産における農薬残留リスク評価、飼料添加物の安全使用指針、ならびに泌乳関連薬物の適正投与設計に対し、新たな科学的根拠を提供するものであり、今後の *in vivo* 検証および分子機構のさらなる解明が強く期待される。

第五章 材料および方法

5.1 実験動物

実験に供試する ICR マウスは、日本 SLC 株式会社 (静岡、日本) から購入した。細胞培養に使用する MEC を単離するため、未経産の ICR メスマウス (9-13 週齢) を頸椎脱臼し、第 4 乳腺を採取した。また、分娩後 5 日目のメスマウスから第 4 乳腺と脳を採取し、RNA の抽出とパラフィンブロック作製に使用した。すべてのマウスは、自由採食 (ラボ MR ストック、日本農産工業、日本)、22~24°C で 12 時間の明暗条件下で飼育した。本研究における動物実験は、北海道大学動物資源委員会 (#18-0154) によって承認されており、国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定に基づく北海道大学動物実験施設マニュアルに従って行った。

5.2 試薬類

本研究に使用したドーパミン塩酸塩、ブロモクリプチン、ドンペリドン、およびピクロトキシンは Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA) から購入した。4-アミノ酪酸、フルマゼニルおよびジアゼパムは和光純薬工業 (大阪) から購入した。ガボキサドール塩酸塩と L-2-アリルグリシン塩酸塩は東京化成工業 (東京) から購入した。プロフラニドは TargetMol (Boston, MA, USA) から購入した。ウェスタンブロッティングには、表 2 の一次抗体を使用した。免疫蛍光染色には、表 3 の一次抗体を使用した。ウェスタンブロッティングに使用するホースラディッシュペルオキシダーゼ標識二次抗体 (1:5000) は、Sigma-Aldrich から購入した。免疫染色に使用する Alexa Fluor 標識二次抗体 (1:400) は、Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) から購入した。これらの抗体は使用するまで -20°C で保存した。

5.3 培地調製

増殖培地として、5% ウシ胎仔血清 (FBS, Boehringer Mannheim, Ingelheim am Rhein, Germany)、5 $\mu\text{g/mL}$ インスリン (和光純薬工業)、10 ng/mL 上皮成長因子 (EGF, BD Biosciences, San Jose California, CA, USA) を含む RPMI-1640 培地 (和光純薬工業) を使用した。

なお、FBS は 37°Cで

表 2 ウェスタンブロッティングで用いた一次抗体

抗体名	由来	希釈率	メーカー
D2R	ウサギ	1000	Merck Millipor
α s1-casein	ウサギ	1000	Santa Cruz Biotechnology
β -casein	マウス	1000	Santa Cruz Biotechnology
lactoferrin	ウサギ	4000	Life Laboratory Company
Claudin3	ウサギ	1000	Thermo Fisher Scientific
Claudin4	ウサギ	1000	Thermo Fisher Scientific
p-STAT5	ウサギ	1000	Cell Signaling Technology
STAT5	ウサギ	1000	Cell Signaling Technology
p-GR	ウサギ	1000	Cell Signaling Technology
GR	ウサギ	1000	Sigma-Aldrich, Saint Louis
p-STAT3	ウサギ	1000	Cell Signaling Technology
STAT3	ウサギ	1000	Santa Cruz Biotechnology
p-NF κ B p65	ウサギ	1000	Cell Signaling Technology
NF κ B p65	ウサギ	1000	Abcam
p-Akt	ウサギ	1000	Cell Signaling Technology
Akt	ウサギ	1000	Cell Signaling Technology
p-mTOR	ウサギ	1000	Cell Signaling Technology
mTOR	ウサギ	1000	Cell Signaling Technology
p-ERK	ウサギ	1000	Cell Signaling Technology
ERK	ウサギ	1000	Cell Signaling Technology
p-JNK	ウサギ	1000	Cell Signaling Technology
JNK	ウサギ	1000	Cell Signaling Technology
p-p38	ウサギ	1000	Cell Signaling Technology
P38	ウサギ	1000	Cell Signaling Technology
Ki67	ウサギ	800	Abcam
BAX	ウサギ	1000	BioLegend
Bcl2	マウス	1000	BioLegend
α -tubulin	マウス	4000	Sigma-Aldrich
β -actin	マウス	1000	Thermo Fisher Scientific,

表 3 免疫染色で用いた一次抗体

抗体名	由来	希釈率	メーカー
β -casein	マウス	300	Santa Cruz Biotechnology
GM130	ウサギ	800	Abcam, Cambridge
Adipophilin	モルモット	500	Progen
Claudin3	ウサギ	400	Thermo Fisher Scientific,
Claudin4	ウサギ	400	Thermo Fisher Scientific
occludin	マウス	800	Thermo Fisher Scientific
p-STAT5a	ウサギ	300	Cell Signaling Technology
Ki67	ラット	300	Agilent Technologies
cleaved caspase-3	ウサギ	300	Thermo Fisher Scientific
D2R	ウサギ	300	Merck Millipor

30 分間の非働化処理を施した。分化培地として、1% FBS、10 μ g/mL インスリン、10 ng/mL EGF、0.1%ウシ脳下垂体抽出物 (BPE、クラボウ、大阪)、1 μ M デキサメタゾン (Dex, Sigma-Aldrich)を含む RPMI-1640 培地を使用した。

MEC の三次元培養用の増殖培地として、10% FBS、1% ITS-X Supplement (和光純薬工業)、20 ng/mL EGF、1 μ M デキサメタゾンを含む DMEM/F12 培地 (和光純薬工業)を調製した。乳管伸長誘導培地および乳腺胞出芽誘導培地として、1% ITS-X Supplement、50 ng/mL FGF2 (ナカライ、京都) を含む DMEM/F12 培地を調製した。内腔形成誘導培地として、1% ITS-X Supplement、20 ng/mL EGF を含む基礎培地を調製した。

5.4 MEC の単離

先行研究 (Kobayashi *et al.*, 2016)の方法に従って、乳生産能力と強固な TJ を有する MEC の培養モデルを作製した。リンパ節と結合組織を除去した第 4 乳腺を細切した後、0.75 mg/ml コラゲナーゼ (和光純薬工業)を含む RPMI 1640 培地に浸漬し、37°Cの恒温振盪機 (TAITEC)内で 1 時間振盪させた。その後、パスツールピペットでピペッティングを行い、さらに 1 時間振盪させた。再度ピペッティングを行い、乳腺片を肉眼では見えない程度まで分解した後、遠心分離機 (KUBOTA2010、久保田製作所、東京)で遠心分離 (645 g、1 分間)した。上清を取り除いた後、得られた沈殿に 0.2%トリプシンを含む RPMI 1640 培地を加えて 1 分間ピペッティングしながら反応させた。懸濁液を遠心分離 (645 g、1 分間)して、上清を取り除いた後、50% FBS を含む RPMI 1640 培地に再懸濁し、低速 (3 g、5 分間) で遠心分離した。上清を取り除いた後、沈殿を RPMI 1640 培地に再懸濁し、遠心分離 (645 g、1 分間)した。この沈殿に前述のトリプシン処理と FBS による遠心分離を再度行い、線維芽細胞や筋上皮細胞を含まない MEC 塊を単離した。

5.5 MEC の単層培養

前述の「5.4」により得られた MEC 塊を増殖培地で懸濁した。この懸濁液を 12 well 細胞培

養プレート (FALCON, Corning, NY, USA)の各 well に立てた 2 個のクローニングシリンダー (直径 5 mm、ミスミグループ、東京)、もしくは 35 mm 細胞培養シャーレ (FALCON, Corning) に立てた 4 個のクローニングシリンダーの内側に 170 μ l ずつ滴下した。また、シリンダーの外側にも増殖培地を適量入れた。シリンダーが動かないように注意しながら 4 日間培養した後、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。

インサート培養の場合は、24 well 用のセルカルチャーインサート (0.4 μ M ポアサイズ、FALCON, Corning)の上層に、MEC 塊を懸濁した増殖培地を 200 μ l ずつ滴下し、下層に増殖培地 800 μ l を加えた。その状態で 4 日間培養した後、新しい増殖培地に交換し、さらに 2 日間培養した。続いて、分化培地に交換した後、37°Cで 2 日間培養し、MEC の乳産生と TJ 形成を誘導した。その後、実験に応じてプロモクリプチンやドンペリドンを含む分化培地に交換し、さらに 3 日間 39°Cで培養した。

5.6 MEC の三次元培養

前述の「6.4」により得られた MEC 塊に PBS 5 ml を加えて低速で遠心分離 (3 g、5 分間)し、0.05%トリプシンと 2 mM EDTA を含む PBS 5 ml で懸濁した後、37°Cインキュベーター内で 15 分間培養した。その後、懸濁液に 4% FBS を含む基礎培地 5 ml を加えて遠心分離 (645 g、5 分間)し、得られた MEC 塊を三次元培養用の増殖培地で 1.0×10^6 cells/ml に懸濁した。懸濁液 170 μ l を 12 well プレートの各 well に配置した細胞非接着性の 12%アクリルアミドゲル (12%アクリルアミド、0.1%過硫酸アンモニウム、0.1%テトラメチレンジアミン /PBS、厚さ 0.75 mm)上に置いたシリンダー内に滴下した。各 well に増殖培地を 800 μ l 加えて 37°C、5% CO₂ インキュベーター内で 16 時間培養し、MEC のオルガノイドを作製した。なお、本実験で供試したアクリルアミドゲルは、70%エタノールに浸漬して殺菌し、エタノールを除去するためクリーンベンチ内で PBS により 3 回洗浄して 4°Cで一晩静置した後、使用直前に PBS で 3 回、基礎培地で 3 回洗浄したものを使用した。

三次元培養における基層ゲルを作製するため、12 well プレートの各 well に置いたカバーグ

ラス (直径 15 mm、丸型、松浪硝子、大阪)上の中心に Matrigel (Corning)を 20 μ l ずつ垂らして、37°Cで 30 分間インキュベーターしてゲル化させた。続いて、MEC のオルガノイドを 10–12 organoids/ μ l となるように Matrigel (乳腺胞出芽モデルと乳腺胞内腔形成モデルの場合)もしくはコラーゲンと Matrigel の混合溶液 (乳管伸長モデルの場合)に懸濁し、ゲル化させた基層ゲルの上に 40 μ l ずつ滴下した。なお、コラーゲンと Matrigel の混合溶液は、Collagen Type I (ウシ皮膚由来、ペプシン抽出、ニッピ) を 5 倍濃縮 DMEM 培地 (Sigma-Aldrich)と 7:2 で混合した後にコラーゲン再構成緩衝液 (50 mM 水酸化ナトリウム、260 mM 炭酸水素ナトリウム、200 mM HEPES)を混合溶液の 1/9 量加えて均質化し、この中性コラーゲン溶液と Matrigel と DMEM 培地を 5:3:2 の比率で混合することで調製した。その後、37°Cで 40 分間インキュベーターして、オルガノイドを包埋しながらゲル化したものを培養ゲルとし、培養ゲルが完全に浸るように形態形成誘導培地を加えて 37°Cで培養した。培地交換は包埋 2 日後に行った。培養中のオルガノイドは、倒立型位相差顕微鏡と顕微鏡専用デジタルカメラ (DSFI3、ニコン、東京)を用いて観察、撮影した。なお、乳腺上皮組織の乳管伸長、乳腺胞出芽、および乳腺胞の内腔形成は図 6-1 の方法で評価した。



図 5-1 乳腺上皮オルガノイドの形態的特徴を評価するための測定部位

MEC の 3D 培養において伸長、出芽および内腔形成誘導したオルガノイドの例。(A) 乳管の長さは、各オルガノイドの長軸方向に最も伸びた枝様構造の基部から末端までの区間 (赤)を測定した。(B) 乳腺胞様構造数は各オルガノイドから突起した部位 (緑)をカウントすることで算出した。(C) 乳腺胞断面積として、各オルガノイド断面 (青)の面積を測定した。スケールバーは 100 μ m を示す。

5.7 ウェスタンブロッティング用のサンプル調製

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、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、0.5% SDS、プロモフェノールブルー)を用いた。培地を回収する際には、MEC を培養しているプレートを手軽に揺らして培地成分を均一にした後、培地を 5 倍濃縮の SDS-PAGE 用サンプルバッファーを 4:1 の比率で混合した。細胞層を回収する際には、200 μ L のサンプルバッファーを 12 well 細胞培養プレートもしくはインサートの内側に加えた。三次元培養モデルのオルガノイドを回収するため、培養ゲルをチューブに回収し、2 倍濃縮のサンプルバッファー 100 μ L と 2-メルカプトエタノール 4 μ L を加えた。各サンプルの液量が 200 μ L になるように基礎培地を加えて調製した後、ボルテックスミキサーで攪拌、さらにピペッティングを行ってゲルを溶解させた。各サンプルは、70°C で 15 分間加熱処理を行い、使用するまで -20°C で保存した。

5.8 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、SDS-PAGE 用のアクリルアミドゲルを作製した。まず分離ゲル (7.5–12.5%アクリルアミド、375 mM Tris-HCl; pH 8.8、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, Hercules, CA, USA)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。サンプルもしくは分子量マーカー (日本ジェネティクス、東京)を各レーンにアプライし、電気泳動を行った。なお、電流は濃縮ゲルの場合は 1 枚あたり 10 mA、分離ゲルの場合は 13 mA とし、電圧は 180V を超えないようにした。プロモフェノールブルーがゲルの下端まで到達した段階で電気泳動を終了した。濃縮ゲルを取り除いたゲルと PVDF 膜を密着させた後、タンク式ブロッティング装置 (Bio-Rad)にセットし、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)を加えた。電圧を 60V として 4°C で 2 時間通電し、ゲルから PVDF 膜へタンパク質を転写させた。

転写終了後、PVDF 膜の余分な部分をトリミングし、ブロッッキング溶液に浸して室温で 1 時間反応させた。ブロッッキング溶液は 0.05% Tween 20 を含む PBS (PBS-T) に 0.5% BSA と 1% Fish gelatin (Sigma-Aldrich) を溶解させたもの、あるいは 4% スキムミルク (和光純薬工業) を溶解させたものを用いた。ブロッッキング処理後、PVDF 膜をシーリングシートではさみ、2.5% BSA を含む 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。一次抗体に 4℃ で 2 日間反応させた後、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、振盪させながら 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、ブロッッキング溶液で希釈した二次抗体を加えて室温で 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 Luminate Forte Western Substrate (Merck Millipore Billerica, MA, USA) に 5 分間室温で反応させ、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。

5.9 免疫染色

シャーレもしくはセルカルチャーインサートで培養した MEC 層を -20℃ のメタノール (関東化学、東京) に 10 分間、4℃ の 1% ホルムアルデヒドを含む PBS に 10 分間浸漬した。その後、シャーレ上の MEC 層をリキッドブロッカー (大道産業、群馬) で囲んだ。また、セルカルチャーインサートの場合は、メスを用いて細胞層が形成されているインサート膜を切り抜いた。続いて、1% パラホルムアルデヒド (PFA)/PBS 溶液に浸漬し、4℃ 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、ブロッッキング処理を行うため、5% BSA を含む PBS-T に室温で 1.5 時間浸漬した。ブロッッキング処理後、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℃ で 3 日間反応させた。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、2.5% BSA/PBS-T 溶液で希釈した二次抗体に室温で 1 時間反応させた。なお、二次抗体には核染色のために 2.5 $\mu\text{g/ml}$ DAPI (Sigma-Aldrich) も加えた。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 BioSystem, Chicago, IL, USA) を垂らして封入し、室温で乾燥させた後、遮光保存した。染色したサンプルは共焦点レーザー走査顕微鏡 (TCS SP5, Leica, Wetzlar, Germany) で観察および撮影を行った。

5.10 TUNEL 染色

アポトーシスを検出するため TUNEL アッセイキット (Promega, Madison, WI, USA) を使用した。培養後の MEC を 4 $^{\circ}\text{C}$ の 1% PFA/PBS で 25 分間固定した。PBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄した後、透過処理のために 0.2% Triton X-100/PBS に 5 分間インキュベートした。TUNEL 反応液で 37 $^{\circ}\text{C}$ の暗所で 1 時間処理した後、核を DAPI で染色した。染色された MEC の画像は、共焦点レーザー走査顕微鏡 (TCS SP5) を使用して取得した。TUNEL 陽性の細胞核と DAPI 陽性の全細胞核の比率を測定するために、実験の各サンプルからランダムに 10 枚の写真を撮り、各サンプルの平均比率を統計解析に使用した。

5.11 パラフィン切片の作製

パラフィン切片を作製するため、4% PFA/PBS で固定した乳腺を包埋用カセット (サクラファインテックジャパン、東京) 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、95% 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 分間浸漬した。続いて 60 $^{\circ}\text{C}$ の恒温乾燥器 (DX-58, ヤマト科学、東京) 内に設置した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 60 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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、埼玉)で 5 μm 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 (76×26 mm、武藤化学、東京)に乗せた。これを伸展器 (KN-210-6、夏目製作所、東京)に置き、37°Cで一晩乾燥させ、室温で保存した。

5.12 RNA 抽出と逆転写

RNA の抽出には ISOGENII (和光純薬工業)を用いた。抽出した RNA は、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (東洋紡、大阪)を用いてゲノム DNA を除去した後、cDNA への逆転写を行った。逆転写反応は、37°Cで 15 分間行い、続いて 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。

5.13 PCR

cDNA の PCR は、Life Touch サーマルサイクラー (Life Eco, Bioer Technology, Hangzhou, China)を用いて、SYBR Green Master Mix 5 μl 、DNA Template 0.1 μl 、プライマーmix (10 μM の Forward、Reverse primer 各 0.5 μl 、および Nuclease-Free Water 4.5 μl を調製し、10 μl のスケールで行った。PCR の設定は 94°C/2 分間を 1 回、94°C/30 秒、58°C/30 秒、68°C/50 秒を 40 回、72°C/15 分間を 1 回にした。プライマーとしては、表 4 に示したものを使用した。*Gapdh* を内部標準として用いた。

5.14 乳タンパク質の定量 PCR

定量 PCR は Light Cycler 480 II (Roche Applied Science, Penzberg, Germany)を用いて、SYBR Green Master Mix 5 μl 、cDNA Template 0.2 μL 、プライマーmix (10 μM Forward/Reverse primer) 各 0.5 μl および Nuclease-Free Water 4.3 μl を調製し、10 μl のスケールで行った。qPCR は 95°C/60 秒を 1 回、95°C/115 秒と 58°C/60 秒を 40 回、95°C/5 秒を 1 回、60°C/60 秒を 1 回、50°C/30 秒を 1 回の条件下で反応を行った。プライマーとしては、表 4 に示したものを使用し

た。 *Gapdh* を内部標準として用いた。

5.15 細胞増殖性および細胞生存性の評価

前述の「6.4」により得られた MEC 塊を増殖培地で懸濁した。この懸濁液を 96 well 細胞培養プレート (FALCON, Corning) の各 well に 100 μ l ずつ滴下した。細胞増殖性を評価する場合は播種から 2 日間培養した後、神経伝達物質もしくはその受容体に反応する薬物を含む増殖

表 4 使用したプライマー配列

Gene	Accession No.	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
<i>Drd1</i>	NM_001291801.1	AGTGACTCTAAAGCAA GGGCAT	CTTCTGGGTTTCAGTGCT CCA
<i>Drd2</i>	NM_001410193.1	CCATTGTCTGGGTCCTG TCC	GTGGGTACAGTTGCCCT TGA
<i>Drd3</i>	NM_007877.2	ATTGTGCTCGGGGCCTT	GGGTTATCCTGCTTCAC GAAT
<i>Drd4</i>	NM_007878.4	AGCGCTACTGAGGACG GT	ACCCTGGACCTCGGAGT
<i>Gad1</i>	NM_008077.6	TCCAAGAACCTGCTTTC CTGT	GGATATGGCTCCCCAG GAG
<i>Gad2</i>	NM_008078.2	AGACAGCACGTTTCCTG TCCCTGTGT	TTTCACCACGTACTGAA GCAAAATGTTC
<i>Gat1</i>	NM_008131.5	CCACCTCAGCAAGTTCC CACTT	TCAGACCATTCCTCCTCC CGCAT
<i>Gabrb1</i>	NM_008071	ACAGCTCCAATGAACCC AGCAA	TGCTCCCTCTCCTCCATT CCA
<i>Gabrb2</i>	NM_008071.2	GGAGTGACAAAGATTG AGCTTCCT	GTCTCCAAGTCCCATTA CTGCTTC
<i>Gabrb3</i>	NM_008071.3	CCGTCTGGTCTCCAGGA ATGTTGTC	CGATCATTCCTTGGCCTT GGCTGT
<i>Gabbr1</i>	NM_019439.4	CTGCCCCGGATGTGGAAC CTTA	TCAGCATACCAACCCGAT GAGA
<i>Gabbr2</i>	NM_001081141.2	ATCGAGAGATCCGCAA CGAG	ACACAACCTTGACCCGTG ACCC
<i>Csn1</i>	NM_007784	CCTTTCCCCTTTGGGCT TAC	TGAGGTGGATGGAGAAT GGA
<i>Csn2</i>	NM_009972	CTTCAGAAGGTGAATCT CATGGG	CAGATTAGCAAGACTGG CAAGG
<i>Ltf</i>	NM_008522	GGCTGAGAAGGCAGGA AATG	TTTGGGGVTATGGCTAG GTG
<i>Gapdh</i>	NM_008084	GAGCGAGACCCCACTA ACATC	GCGGAGATGATGACCCT TTT

培地に交換し、さらに2日間培養した。細胞生存性を評価する場合はコンフルエントまで増殖培地で培養した後、分化培地で2日間培養し、神経伝達物質もしくはその受容体に反応する薬物を含む分化培地に交換し、さらに培養した。培養後、細胞増殖測定用 WST-8 試薬 (キシダ化学、大阪)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、細胞数を相対的に評価した。

5.16 死細胞の測定

細胞死を評価するため、まず培地中に浮遊している死細胞を回収した。次に、シャーレ底面に接着した細胞を0.05%トリプシンおよび2 mM EDTA (ナカライ)を含むPBSで剥離し、先に回収した培地と合わせて300 × gで5分間遠心分離した。その後、得られた細胞を0.2%トリパンブルーを含むPBSに再懸濁した。トリパンブルーで染色された細胞を死細胞として、血球計算盤を用いて総細胞数と死細胞数をカウントした。

5.17 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MECとMillicel-EPS system (Merck Millipore)を用いて行った。細胞層と接触しないようにセルカルチャーインサートの内層と外層の培地に電極を挿入し、インサート膜上に形成されたMEC層の電気抵抗値を測定した。なお、電気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。

5.18 cAMP 濃度の測定

細胞内cAMP濃度は、メーカーの手順に従いcAMP XP Assay Kit (#4339, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)を用いて測定した。6 × 10⁴個の乳腺上皮細胞を12wellプレートに播種し、ブロモクリプチンおよび/またはドンペリドンを含む分化培地中で24時間培養し

た。培養後、細胞を冷 PBS で洗浄し、氷上で 10 分間 cell lysis buffer を用いて溶解した。得られた細胞溶解液を遠心して細胞破片を除去した。サンプル中の cAMP 絶対量は、cell lysis buffer 中の既知濃度 (0, 0.3, 1.0, 3.0, 8.9, 26.7, 80 nM) の cAMP 標準曲線に基づいて算出した。溶解液および標準溶液を、マイクロウェルに加え、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (Horseradish Peroxidase, HRP) 結合 cAMP とともに室温で 3 時間インキュベートした。反応後、過剰な cAMP および HRP 結合 cAMP を洗浄により除去し、HRP 基質を添加し、吸光度を 450 nm でマイクロプレートリーダー (Bio-Rad) を用いて測定した。

5.19 ドーパミン濃度測定

細胞内と細胞外ドーパミンは、メーカー手順に従いドーパミン ELISA Kit (BA-E-5300R、和光純薬工業) を用いた競合法 ELISA で測定した。キット指定の方法に従って細胞と培地を前処理し、測定に供した。細胞分解溶液および標準溶液をマイクロウェルに加え、HRP 結合 cAMP とともに室温で 3 時間インキュベートした。反応後洗浄バッファーで 3 回洗浄し、HRP 基質であるテトラメチルベンジジンを添加して 10 分間発色させた。停止液で反応を止め、450 nm で吸光度を測定し (Bio-Rad)、標準溶液から作成した標準曲線に基づいて培地中のドーパミン量を算出した。

5.20 GABA 濃度測定

培地中の GABA 濃度は、メーカー手順に従い Mouse gABA ELISA Kit (ELK8591, ELK Biotechnology, TX, USA) を用いた競合法 ELISA により測定した。培地サンプルおよび標準液をマイクロウェルに添加し、HRP 標識 GABA とともに 37°C で 1 時間インキュベートして反応させた。反応後洗浄バッファーで 3 回洗浄し、テトラメチルベンジジン基質を添加して発色させた。停止液で反応を止め、450 nm で吸光度を測定し、標準溶液から作成した標準曲線に基づいて培地中の GABA 量を算出した。

5.21 塩素イオンのライブイメージング

蛍光色素 N-エトキシカルボニルメチル-6-メトキシキノリニウムブロミド (MQAE、和光純薬工業)を用い、細胞内 Cl⁻濃度変化を測定した。MQAE は 365 nm で励起され、450 nm で蛍光を発する。この蛍光強度は MQAE を含む溶液中の Cl⁻濃度に逆比例する。また、他のイオン濃度の影響は影響を受けない。まず、MQAE を細胞内に導入するため、細胞を 10 mM MQAE を含む分化培地中で 37°C、1 時間培養した。続いて、細胞を 37°C の PBS で 5 回洗浄した後、新鮮な分化培地 1.8 mL を添加した。初期蛍光強度を記録した後、50 μ M のフルメチルメタクリレート、アジスロマイシン、またはピクロトキシンをそれぞれ 200 μ L ずつ培養培地に添加し、細胞内蛍光強度の変化を経時的に測定した。すべての MQAE 実験は、色素の細胞外漏出を最小限に抑えるため、共焦点レーザー走査顕微鏡 (TCS SP5) に設置した 37°C の恒温ステージの上で行った。

5.22 統計解析

統計解析結果は、4–6 回の実験の平均値 $\pm$ SEM として表示した。すべての培養実験は、異なるマウスに由来する MEC を使用して 3 回以上行った。なお、2 群の比較には対応のない学生 t 検定を使用し、多重比較には Tukey 検定を使用した。統計的有意性は $p < 0.05$ とした。

総括

従来、ドーパミンや GABA などの神経伝達物質は主に中枢神経系で機能すると考えられてきたが、近年の研究により、非神経組織でもこれらの分子が産生され、局所的なオートクライン・パラクライン因子として機能することがわかってきた。しかし、乳腺における神経伝達物質の役割と意義については未解明な点が多く残る。そこで本研究では、乳腺が神経伝達物質シグナルを自律的に調節する非神経組織であり、神経伝達物質シグナルが乳腺上皮細胞の生存性や機能性を調節するかについて検証した。まず第二章では興奮性の代表的な神経伝達物質であるドーパミンと乳腺上皮細胞の関連性について調べた。続いて、第三章では抑制性の代表的な神経伝達物質である GABA シグナルと乳腺上皮細胞の関連性について調べた。そして第四章では GABA 受容体やドーパミン受容体受容体を標的とする外因性化学物質 (殺虫剤・飼料添加物・薬物) が乳腺上皮細胞に及ぼす影響について調べた。それらの結果、乳腺が GABA やドーパミンを自律的に合成・分泌する組織であること、乳腺上皮細胞が GABA_A 受容体とドーパミン D2 受容体を介して生存性や乳産生を調節する細胞であること、外因性の殺虫剤・飼料添加物・薬物が乳腺上皮細胞における GABA 受容体とドーパミン受容体を介した調節機構に作用して妊娠期の乳腺上皮組織発達や泌乳期の乳産生に影響することが明らかになった。

第二章の結果から、乳腺上皮細胞はドーパミン D2 受容体を発現し、とくに乳分泌誘導後の細胞でその発現が増加することが明らかになった。さらに、D2 受容体が TJ 近傍の頂端側部細胞膜に局在していたことから、ドーパミンシグナルが乳腺上皮細胞の細胞極性やバリア機能と密接に関わる可能性も示された。D2 受容体は GPCR であり、細胞内セカンドメッセンジャーである cAMP の産生を抑制することが知られている。本研究においても D2 受容体アゴニストのプロモクリプチンは細胞内 cAMP 濃度を低下させ、細胞生存性の低下、乳産生の抑制、さらに乳産生促進性の転写調節因子である STAT5 の不活性化を引き起こした。一方、D2 受容体アンタゴニストであるドンペリドンは cAMP を上昇させたものの、単独では細胞生存性や乳成分産生に顕著な影響を与えなかった。しかし、ドンペリドンはプロモクリ

プチンによる cAMP 低下、細胞生存性の低下、乳産生抑制および STAT5 の不活性化を拮抗的に抑制した。これらの結果から、乳腺上皮細胞は自律的にドーパミンを産生し、D2R を介して細胞内 cAMP 濃度を変化させ、cAMP シグナルを中心とした経路で自身の生存性や機能性を調節する機構を有していることがわかった。従来、ドーパミンは脳下垂体細胞に作用し、そのプロラクチン分泌を介して乳腺上皮細胞を調節していることのみが知られていた。したがって、本研究の成果はドーパミンの乳腺局所における生理的な役割を新たに提示するものであると考えられる。

第三章では、乳腺上皮細胞が抑制性神経伝達物質である GABA を自律的に産生し、Cl⁻チャンネル型の GABA_A 受容体を介して自らの細胞内 Cl⁻濃度を調節していることが明らかとなった。泌乳誘導した乳腺上皮細胞の培地中に高濃度の GABA が蓄積することも示され、乳腺が GABA リッチな微小環境を形成し、その環境下で乳腺上皮細胞の生理機能を調節している可能性が強く示された。興味深いことに、GABA_A 受容体の活性化・不活性化のいずれにおいても乳腺上皮細胞の細胞生存性は低下し、アポトーシスが誘導され、乳タンパク質の産生が顕著に抑制された。また、ピクロトキシンによる Cl⁻チャンネルの直接阻害でも同様に乳産生が低下することが示された。これらの結果から、乳腺上皮細胞における GABA_A 受容体を介した細胞内 Cl⁻濃度は非常に狭い最適濃度域のもとで機能しており、その濃度を超えた場合には乳腺上皮細胞の生存性や機能性が著しく損なわれると考えられる。乳腺上皮細胞には GABA_A 受容体以外にも Cl⁻イオン輸送に関わるチャンネルや輸送体が存在する。また、Cl⁻イオン輸送と相互作用するイオンチャンネルの発現も知られている。すなわち、GABA_A 受容体を含む多くのイオンチャンネルや輸送体を介した Cl⁻イオン動態の調節が乳腺上皮細胞の生理機能にきわめて重要な役割を果たしていることが示唆された。

第四章では、GABA_A 受容体とドーパミン D2 受容体を標的とする外因性化学物質が乳腺上皮細胞の生理的機能にどのように影響するかを培養下で調べ、農薬、飼料添加物、および薬物が乳牛の乳生産性に及ぼす潜在的なリスクを調べた。その結果、殺虫剤として農地に散布されているプロフラニリドは、生体内に蓄積しうるナノモル濃度でも乳腺上皮細胞の増殖

を抑制してアポトーシスを誘導し、細胞生存性に関わる Akt/mTOR 経路の不活性化と細胞死を制御する BAX/Bcl2 バランスの破綻を引き起こすことが明らかになった。また、乳産生に関わるシグナル分子である STAT5 を不活性化させると同時にカゼイン産生能を低下させ、さらに炎症に関するシグナルの乱れを引き起こすことも示された。続いて、飼料添加物として使用される外因性 GABA について調べたところ、摂取量から推定される濃度域を超えた場合においても GABA は乳腺上皮細胞の乳産生、細胞生存性、TJ 形成に大きな影響を与えないことが明らかとなった。最後に、生殖周期の調整や無発情の解消の際に家畜に投与される D2 受容体拮抗薬ドンペリドンが妊娠期の乳腺上皮組織発達に及ぼす影響を三次元培養モデルを用いて調べた結果、ドンペリドンが Akt 経路や ERK 経路を時期特異的に乱し、乳管伸長を促進する一方で乳腺胞出芽を促進することがわかった。これらの結果は、神経伝達物質の受容体を標的とする外因性化学物質の一部が妊娠期や泌乳期の乳腺上皮細胞に作用し、その形態形成や乳産生に影響する可能性を示しており、酪農現場における薬物・飼料添加物・農薬の使用管理の重要性を改めて提起するものであると考えられる。

本研究を通して乳腺上皮細胞が興奮性の神経伝達物質であるドーパミンと抑制性の神経伝達物質である GABA を自ら合成・分泌できること、乳腺上皮細胞には GPCR の D2R 受容体とイオンチャネル型受容体である GABA_A 受容体が発現し、機能していることが明らかとなった。また、乳腺微小環境におけるこれらの受容体の活性化と不活性化が細胞増殖、アポトーシス、乳タンパク質産生、炎症、およびそれらの関連シグナル分子を調節し、泌乳期における乳腺上皮細胞の生理的な役割を多面的に制御している可能性が示された。さらに、神経伝達物質受容体の発現は乳腺発達の段階に応じて変動し、これらの受容体が乳腺上皮組織の発達を調節する潜在的な能力を有することが示唆された。これらの知見は、乳腺上皮細胞における神経伝達物質を自律的なオートクライン・パラクライン機構を担う生理活性物質として再評価する必要性を示すものである。さらに、神経伝達物質を中心とした調節機構が農薬、飼料添加物、家畜用薬剤といった外因性化学物質の影響を受け、乳腺上皮細胞の生理機能に直接影響する可能性を示すものでもあった。今後、本研究で得られた知見に基づき、乳

腺における神経伝達物質と乳生産性の因果関係をさらに解明することにより、家畜の乳生産性改善に資する知見が得られることが期待される。

要旨

従来、GABA やドーパミンなどの神経伝達物質は主に中枢神経系で機能すると考えられてきた。しかし、近年の研究により、非神経組織でもこれらの神経伝達物質が産生され、局所的なオートクライン・パラクライン因子として機能することがわかってきた。一方で乳腺における神経伝達物質の役割と意義については未解明な点が多く残る。そこで本研究では、乳腺が神経伝達物質シグナルを自律的に調節する非神経組織であり、神経伝達物質シグナルが乳腺上皮細胞の生存性や機能性を調節するかについて検証した。

まず、興奮性の代表的な神経伝達物質であるドーパミンと乳腺上皮細胞の関連性について調べた。その結果、乳腺上皮細胞はドーパミン D2 受容体を発現し、特に乳分泌誘導後の細胞でその発現が増加することがわかった。また、D2 受容体のアゴニストのプロモクリプチンが cAMP 低下、細胞生存性の低下、乳産生の抑制を誘導することが示された。一方、D2 受容体アンタゴニストであるドンペリドンは cAMP を上昇させたものの、単独では細胞生存性や乳成分産生に顕著な影響を与えなかった。しかし、ドンペリドンはプロモクリプチンによる cAMP 低下、細胞生存性の低下、乳産生抑制を拮抗的に抑制した。これらの結果から、乳腺上皮細胞は自律的にドーパミンを産生し、D2R を介して細胞内 cAMP 濃度を変化させ、cAMP シグナルを中心とした経路で自身の生存性や機能性を調節する機構を有していると考えられる。

続いて、抑制性の代表的な神経伝達物質である GABA と乳腺上皮細胞の関連性について調べた。その結果、乳腺上皮細胞が GABA を自律的に産生し、Cl⁻チャネル型の GABA_A 受容体を介して細胞内 Cl⁻濃度を調節していることがわかった。また、GABA_A 受容体の活性化と不活性化は乳腺上皮細胞の細胞生存性を低下させ、アポトーシスを誘導し、乳タンパク質の産生を抑制した。同様の結果は、ピクロトキシンによる GABA_A 受容体の Cl⁻チャネルの直接阻害でも示された。これらの結果から、乳腺上皮細胞における GABA_A 受容体を介した細胞内 Cl⁻濃度は非常に厳密に制御されており、その制御が破綻した場合には乳腺上皮細胞の生存性や機能性が著しく損なわれると考えられる。

最後に、GABA_A 受容体と D2 受容体を標的とする農薬、飼料添加物、および薬物が乳腺上皮細胞の生理的機能に及ぼす影響を培養下で調べ、これらの外因性化学物質が乳牛の乳生産性に及ぼす潜在的なリスクを調べた。その結果、殺虫剤としてプロフラニリドが、生体内に蓄積しうるナノモル濃度においても乳腺上皮細胞の増殖抑制とアポトーシスを誘導し、カゼイン産生能の低下や炎症に関するシグナルの乱れを引き起こすことが示された。続いて、飼料添加物として使用される外因性 GABA について調べたところ、摂取量から推定される濃度域を超えた場合においても GABA は乳腺上皮細胞に大きな影響を与えないことが明らかとなった。また、生殖周期の調整薬として使用される D2 受容体のアンタゴニストであるドンペリドンが妊娠期の乳腺上皮組織発達に及ぼす影響を三次元培養モデルを用いて調べた結果、ドンペリドンが Akt 経路や ERK 経路を時期特異的に乱し、乳管伸長を抑制する一方で乳腺出芽を促進することがわかった。これらの結果は、神経伝達物質の受容体を標的とする外因性化学物質の一部が妊娠期や泌乳期の乳腺上皮細胞に作用し、その形態形成や乳産に影響する可能性を示しており、酪農現場における薬物・飼料・農薬管理の重要性を改めて提起するものであった。

以上、本研究を通して乳腺上皮細胞が抑制性神経伝達物質 GABA と興奮性神経伝達物質ドーパミンを自ら合成・分泌する能力を有すること、乳腺上皮細胞にはイオンチャネル型受容体である GABA_A 受容体と G タンパク質共役型受容体の D2R 受容体の双方が発現することがわかった。また、乳腺微小環境におけるこれらの受容体の活性化と不活性化が細胞増殖、アポトーシス、乳タンパク質産生、炎症、およびそれらの関連シグナル分子を調節し、泌乳期における乳腺上皮細胞の生理的な役割を多面的に制御していることが示された。さらに、これらの受容体が妊娠期の乳腺上皮組織の発達を調節しうる潜在的な能力を有することも示唆された。これらの知見は、乳腺上皮細胞における GABA やドーパミンを自律的なオートクライン・パラクライン因子として再評価する必要性を示すものである。さらに、神経伝達物質を中心とした調節機構が農薬、飼料添加物、家畜用薬剤といった外因性化学物質の影響を受け、乳腺上皮細胞の生理機能に直接影響する可能性を示すものでもあった。今後、本研究

で得られた知見に基づき、乳腺における神経伝達物質と乳生産性の因果関係をさらに解することにより、家畜の乳生産性改善に資する知見が得られることが期待される。

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 若松純一教授並びに上田宏一郎教授に深く御礼申し上げます。また、指導教官である小林謙准教授には、研究の初歩から論文執筆に至るまで、終始一貫して丁寧かつ熱意あるご指導をいただきました。研究者としての姿勢や科学的思考を学ぶうえで、先生から頂いた数々のご助言はかけがえのない財産となりました。ここに深く感謝申し上げます。

共焦点顕微鏡の使用に際して技術的なご助言や実験の最適化に向けた細やかな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の安井雅範様に厚く御礼申し上げます。

細胞組織生物学研究室の学生、院生、研究生の皆様には、日々の研究成果に関する議論や実験方法の相談、ゼミでの温かい交流を通じて、多くの知識と励ましを頂き、研究生活の中で心の支えとなりました。心より感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり実験動物として協力してくれた多くのマウスたちの存在を忘れることはできません。実験動物の犠牲のうえに本研究が成り立っていることを深く受け止め、ここに慎んで追悼の意を表するとともに、心からの感謝を捧げます。

最後に、研究者として歩む機会を与えてくださったすべての方々に、あらためて深謝申し上げます。

参考文献

- Ali, M. H., Muhseen, Z. T., Al-Hajjaj, Z. Y., Al-Ghanimi, H. H., Alshammari, A. & Albekairi, N. A. (2025). In vitro and in silico investigation of the critical role of GABA(B) receptor activation in human breast cancer and its natural agonists. *Oncol Lett* 30(1): 357. <https://doi.org/10.3892/ol.2025.15103>
- Andäng, M., Hjerling-Leffler, J., Moliner, A., Lundgren, T. K., Castelo-Branco, G., Nanou, E., Pozas, E., Bryja, V., Halliez, S., Nishimaru, H., Wilbertz, J., Arenas, E., Koltzenburg, M., Charnay, P., El Manira, A., Ibañez, C. F. & Ernfors, P. (2008). Histone H2AX-dependent GABA(A) receptor regulation of stem cell proliferation. *Nature* 451(7177): 460-464. <https://doi.org/10.1038/nature06488>
- Archer, D. F. (1980). Physiology of prolactin. *Clin Obstet Gynecol* 23(2): 325-335. <https://doi.org/10.1097/00003081-198006000-00005>
- Armstrong, C. M. (2003). The Na/K pump, Cl ion, and osmotic stabilization of cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(10): 6257-6262. <https://doi.org/10.1073/pnas.0931278100>
- Aslanoglou, D., Bertera, S., Sánchez-Soto, M., Benjamin Free, R., Lee, J., Zong, W., Xue, X., Shrestha, S., Brissova, M., Logan, R. W., Wollheim, C. B., Trucco, M., Yechoor, V. K., Sibley, D. R., Bottino, R. & Freyberg, Z. (2021). Dopamine regulates pancreatic glucagon and insulin secretion via adrenergic and dopaminergic receptors. *Transl Psychiatry* 11(1): 59. <https://doi.org/10.1038/s41398-020-01171-z>
- Beaulieu, J. M., Espinoza, S. & Gainetdinov, R. R. (2015). Dopamine receptors - IUPHAR Review 13. *Br J Pharmacol* 172(1): 1-23. <https://doi.org/10.1111/bph.12906>
- Beaulieu, J. M. & Gainetdinov, R. R. (2011). The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev* 63(1): 182-217. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002642>
- Bertucci, P. Y., Quaglino, A., Pozzi, A. G., Kordon, E. C. & Pecci, A. (2010). Glucocorticoid-induced

- impairment of mammary gland involution is associated with STAT5 and STAT3 signaling modulation. *Endocrinology* 151(12): 5730-5740. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0517>
- Bhandage, A. K. & Barragan, A. (2021). GABAergic signaling by cells of the immune system: more the rule than the exception. *Cell Mol Life Sci* 78(15): 5667-5679.
<https://doi.org/10.1007/s00018-021-03881-z>
- Bhat, R., Axtell, R., Mitra, A., Miranda, M., Lock, C., Tsien, R. W. & Steinman, L. (2010). Inhibitory role for GABA in autoimmune inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(6): 2580-2585.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0915139107>
- Bhatia, A., Lenchner, J. R. & Saadabadi, A. (2025). Biochemistry, dopamine receptors. In *StatPearls* Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: jennifer lenchner declares no relevant financial relationships with ineligible companies. Disclosure: Abdolreza saadabadi declares no relevant financial relationships with ineligible companies.: StatPearls Publishing. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538242/>
- Biswas, S. K., Banerjee, S., Baker, G. W., Kuo, C. Y. & Chowdhury, I. (2022). The mammary Gland: Basic Structure and Molecular Signaling during Development. *Int J Mol Sci* 23(7).
<https://doi.org/10.3390/ijms23073883>
- Borcherding, D. C., Hugo, E. R., Idelman, G., De Silva, A., Richtand, N. W., Loftus, J. & Ben-Jonathan, N. (2011). Dopamine receptors in human adipocytes: expression and functions. *PLoS One* 6(9): e25537. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025537>
- Boutinaud, M., Guinard-Flamenta, J. & Jammes, H. (2004). The number and activity of mammary epithelial cells, determining factors for milk production. *Reprod Nutr Dev* 44(5): 499-508.
- BRAKES, C. R., SMITH, R. H. & . (2005). Exposure of non-target small mammals to rodenticides: short-term effects, recovery and implications for secondary poisoning. *Journal of Applied Ecology* 42(1): 118-128. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2005.00997.x>
- Brenner, H. R., Sakmann, B. & . (1978). Gating properties of acetylcholine receptor in newly formed

- neuromuscular synapses. *Nature* 271(5643): 366-368. <https://doi.org/10.1038/271366a0>
- Briggs, K. J., Koivunen, P., Cao, S., Backus, K. M., Olenchok, B. A., Patel, H., Zhang, Q., Signoretti, S., Gerfen, G. J., Richardson, A. L., Witkiewicz, A. K., Cravatt, B. F., Clardy, J. & Kaelin, W. G., Jr. (2016). Paracrine Induction of HIF by Glutamate in Breast Cancer: EglN1 Senses Cysteine. *Cell* 166(1): 126-139. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.042>
- Bucolo, C., Leggio, G. M., Drago, F. & Salomone, S. (2019). Dopamine outside the brain: The eye, cardiovascular system and endocrine pancreas. *Pharmacol Ther* 203: 107392. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.07.003>
- Bundy, J., Ahmed, Y., Weller, S., Nguyen, J., Shaw, J., Mercier, I. & Suryanarayanan, A. (2024). GABA Type A receptors expressed in triple negative breast cancer cells mediate chloride ion flux. *Front Pharmacol* 15: 1449256. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1449256>
- Cabrera, O., Jacques-Silva, M. C., Speier, S., Yang, S. N., Köhler, M., Fachado, A., Vieira, E., Zierath, J. R., Kibbey, R., Berman, D. M., Kenyon, N. S., Ricordi, C., Caicedo, A. & Berggren, P. O. (2008). Glutamate is a positive autocrine signal for glucagon release. *Cell Metab* 7(6): 545-554. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.03.004>
- Caron, A., Palin, M. F., Hovey, R. C., Cohen, J., Laforest, J. P. & Farmer, C. (2020). Effects of sustained hyperprolactinemia in late gestation on mammary development of gilts. *Domest Anim Endocrinol* 72: 106408. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2019.106408>
- Cerbulis, J. & Farrell, H. M., Jr. (1975). Composition of milks of dairy cattle. I. Protein, lactose, and fat contents and distribution of protein fraction. *J Dairy Sci* 58(6): 817-827. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(75\)84644-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(75)84644-3)
- Champion, M. C. (2006). Domperidone. In *Drugs and Lactation Database (LactMed®)* Bethesda (MD): National Institute of Child Health and Human Development.
- Chanat, E., Martin, P. & Ollivier-Bousquet, M. (1999). Alpha(S1)-casein is required for the efficient transport of beta- and kappa-casein from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus of

- mammary epithelial cells. *J Cell Sci* 112 (Pt 19): 3399-3412.
<https://doi.org/10.1242/jcs.112.19.3399>
- Chapman, R. S., Lourenco, P., Tonner, E., Flint, D., Selbert, S., Takeda, K., Akira, S., Clarke, A. R. & Watson, C. J. (2000). The role of Stat3 in apoptosis and mammary gland involution. Conditional deletion of Stat3. *Adv Exp Med Biol* 480: 129-138. https://doi.org/10.1007/0-306-46832-8_16
- Chapman, R. W., Danko, G., Rizzo, C., Egan, R. W., Mauser, P. J. & Kreutner, W. (1991). Prejunctional GABA-B inhibition of cholinergic, neurally-mediated airway contractions in guinea-pigs. *Pulm Pharmacol* 4(4): 218-224. [https://doi.org/10.1016/0952-0600\(91\)90014-t](https://doi.org/10.1016/0952-0600(91)90014-t)
- Chen, H. T., Ruan, N. Y., Chen, J. C. & Lin, T. Y. (2012). Dopamine D2 receptor-mediated Akt/PKB signalling: initiation by the D2S receptor and role in quinpirole-induced behavioural activation. *ASN Neuro* 4(6): 371-382. <https://doi.org/10.1042/an20120013>
- Chen, Y., Leon-Ponte, M., Pingle, S. C., O'Connell, P. J. & Ahern, G. P. (2015). T lymphocytes possess the machinery for 5-HT synthesis, storage, degradation and release. *Acta Physiol (Oxf)* 213(4): 860-867. <https://doi.org/10.1111/apha.12470>
- Cheng, J., Zheng, N., Sun, X., Li, S., Wang, J. & Zhang, Y. (2016). Feeding rumen-protected gamma-aminobutyric acid enhances the immune response and antioxidant status of heat-stressed lactating dairy cows. *J Therm Biol* 60: 103-108. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2016.06.011>
- Cheng, J. B., Bu, D. P., Wang, J. Q., Sun, X. Z., Pan, L., Zhou, L. Y. & Liu, W. (2014). Effects of rumen-protected γ -aminobutyric acid on performance and nutrient digestibility in heat-stressed dairy cows. *J Dairy Sci* 97(9): 5599-5607. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6797>
- Choi, M. R., Kouyoumdzian, N. M., Rukavina Mikusic, N. L., Kravetz, M. C., Rosón, M. I., Rodríguez Fermepin, M. & Fernández, B. E. (2015). Renal dopaminergic system: Pathophysiological implications and clinical perspectives. *World J Nephrol* 4(2): 196-212.
<https://doi.org/10.5527/wjn.v4.i2.196>

- Cohen, B. I. (2002). The significance of ammonia/gamma-aminobutyric acid (GABA) ratio for normality and liver disorders. *Med Hypotheses* 59(6): 757-758. [https://doi.org/10.1016/s0306-9877\(02\)00325-0](https://doi.org/10.1016/s0306-9877(02)00325-0)
- Conn, K. A., Borsom, E. M. & Cope, E. K. (2024). Implications of microbe-derived γ -aminobutyric acid (GABA) in gut and brain barrier integrity and GABAergic signaling in Alzheimer's disease. *Gut Microbes* 16(1): 2371950. <https://doi.org/10.1080/19490976.2024.2371950>
- Daubner, S. C., Le, T. & Wang, S. (2011). Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Arch Biochem Biophys* 508(1): 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.12.017>
- Decavel, C. & Van den Pol, A. N. (1990). GABA: a dominant neurotransmitter in the hypothalamus. *J Comp Neurol* 302(4): 1019-1037. <https://doi.org/10.1002/cne.903020423>
- Deng, Z., Li, D., Wang, L., Lan, J., Wang, J. & Ma, Y. (2024). Activation of GABA(B)R Attenuates Intestinal Inflammation by Reducing Oxidative Stress through Modulating the TLR4/MyD88/NLRP3 Pathway and Gut Microbiota Abundance. *Antioxidants (Basel)* 13(9): 1141. <https://doi.org/10.3390/antiox13091141>
- Deng, Z., Li, D., Yan, X., Lan, J., Han, D., Fan, K., Chang, J. & Ma, Y. (2023). Activation of GABA receptor attenuates intestinal inflammation by modulating enteric glial cells function through inhibiting NF- κ B pathway. *Life Sci* 329: 121984. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.121984>
- Dong, Y., Aronsson, M., Gustafsson, J. A. & Okret, S. (1989). The mechanism of cAMP-induced glucocorticoid receptor expression. Correlation to cellular glucocorticoid response. *J Biol Chem* 264(23): 13679-13683.
- Du, D., Xu, F., Yu, L., Zhang, C., Lu, X., Yuan, H., Huang, Q., Zhang, F., Bao, H., Jia, L., Wu, X., Zhu, X., Zhang, X., Zhang, Z. & Chen, Z. (2010). The tight junction protein, occludin, regulates the directional migration of epithelial cells. *Dev Cell* 18(1): 52-63. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.12.008>
- Duan, M., Zhang, J., Liu, J., Qian, L., Chen, X., Zhao, F., Zhao, W., Zhong, Z., Yang, Y. & Wang, C.

- (2021). Toxic effects of broflanilide exposure on development of zebrafish (*Danio rerio*) embryos and its potential cardiotoxicity mechanism. *Environ Pollut* 286: 117481.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117481>
- Dutta, J., Fan, Y., Gupta, N., Fan, G. & Gélinas, C. (2006). Current insights into the regulation of programmed cell death by NF-kappaB. *Oncogene* 25(51): 6800-6816.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209938>
- Dylewski, D. P. & Keenan, T. W. (1983). Compound exocytosis of casein micelles in mammary epithelial cells. *Eur J Cell Biol* 31(1): 114-124.
- Farmer, C. & Palin, M. F. (2021). Hyperprolactinemia using domperidone in prepubertal gilts: Effects on hormonal status, mammary development and mammary and pituitary gene expression. *Domest Anim Endocrinol* 76: 106630. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2021.106630>
- Ferrero, E., Masini, M., Carli, M., Moscato, S., Beffy, P., Vaglini, F., Mattii, L., Corti, A., Scarselli, M., Novelli, M. & De Tata, V. (2024). Dopamine-mediated autocrine inhibition of insulin secretion. *Mol Cell Endocrinol* 592: 112294. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2024.112294>
- Fitzgerald, P. & Dinan, T. G. (2008). Prolactin and dopamine: what is the connection? A review article. *J Psychopharmacol* 22(2 Suppl): 12-19. <https://doi.org/10.1177/0269216307087148>
- Forinash, A. B., Yancey, A. M., Barnes, K. N. & Myles, T. D. (2012). The use of galactogogues in the breastfeeding mother. *Ann Pharmacother* 46(10): 1392-1404.
<https://doi.org/10.1345/aph.1R167>
- Freeman, M. E., Kanyicska, B., Lerant, A. & Nagy, G. (2000). Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev* 80(4): 1523-1631.
<https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.4.1523>
- Furuse, M. (2010). Molecular basis of the core structure of tight junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(1): a002907. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002907>
- Gargiulo, L., May, M., Rivero, E. M., Copsel, S., Lamb, C., Lydon, J., Davio, C., Lanari, C., Lüthy, I.

- A. & Bruzzone, A. (2017). A Novel Effect of β -Adrenergic Receptor on Mammary Branching Morphogenesis and its Possible Implications in Breast Cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 22(1): 43-57. <https://doi.org/10.1007/s10911-017-9371-1>
- Ghosh, S. & Hayden, M. S. (2008). New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat Rev Immunol* 8(11): 837-848. <https://doi.org/10.1038/nri2423>
- Gilman, A. G. (1987). G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* 56: 615-649. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.56.070187.003151>
- Girnius, N., Edwards, Y. J. K. & Davis, R. J. (2018). The cJUN NH(2)-terminal kinase (JNK) pathway contributes to mouse mammary gland remodeling during involution. *Cell Death Differ* 25(9): 1702-1715. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0081-z>
- Gögelein, H. (1988). Chloride channels in epithelia. *Biochim Biophys Acta* 947(3): 521-547. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(88\)90006-8](https://doi.org/10.1016/0304-4157(88)90006-8)
- Günzel, D. & Yu, A. S. (2013). Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev* 93(2): 525-569. <https://doi.org/10.1152/physrev.00019.2012>
- Haas, H. L., Sergeeva, O. A. & Selbach, O. (2008). Histamine in the nervous system. *Physiol Rev* 88(3): 1183-1241. <https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2007>
- Haddish, K. & Yun, J. W. (2024). Silencing of dopamine receptor D5 inhibits the browning of 3T3-L1 adipocytes and ATP-consuming futile cycles in C2C12 muscle cells. *Arch Physiol Biochem* 130(5): 555-567. <https://doi.org/10.1080/13813455.2023.2206983>
- Hennighausen, L. & Robinson, G. W. (2008). Interpretation of cytokine signaling through the transcription factors STAT5A and STAT5B. *Genes Dev* 22(6): 711-721. <https://doi.org/10.1101/gad.1643908>
- Herlaar, E. & Brown, Z. (1999). p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease. *Mol Med Today* 5(10): 439-447. [https://doi.org/10.1016/s1357-4310\(99\)01544-0](https://doi.org/10.1016/s1357-4310(99)01544-0)
- Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. (1952). A quantitative description of membrane current and its

- application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 117(4): 500-544.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1952.sp004764>
- Hoshino, M., Morita, S., Iwashita, H., Sagiya, Y., Nagi, T., Nakanishi, A., Ashida, Y., Nishimura, O., Fujisawa, Y. & Fujino, M. (2002). Increased expression of the human Ca²⁺-activated Cl⁻ channel 1 (CaCC1) gene in the asthmatic airway. *Am J Respir Crit Care Med* 165(8): 1132-1136. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.165.8.2107068>
- Hou, J., Renigunta, A., Yang, J. & Waldegger, S. (2010). Claudin-4 forms paracellular chloride channel in the kidney and requires claudin-8 for tight junction localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(42): 18010-18015. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009399107>
- Huang, Y. L., Zhao, F., Luo, C. C., Zhang, X., Si, Y., Sun, Z., Zhang, L., Li, Q. Z. & Gao, X. J. (2013). SOCS3-mediated blockade reveals major contribution of JAK2/STAT5 signaling pathway to lactation and proliferation of dairy cow mammary epithelial cells in vitro. *Molecules* 18(10): 12987-13002. <https://doi.org/10.3390/molecules181012987>
- Hughes, K. & Watson, C. J. (2018). The multifaceted role of STAT3 in mammary gland involution and breast cancer. *Int J Mol Sci* 19(6). <https://doi.org/10.3390/ijms19061695>
- Hutchinson, J., Jin, J., Cardiff, R. D., Woodgett, J. R. & Muller, W. J. (2001). Activation of Akt (protein kinase B) in mammary epithelium provides a critical cell survival signal required for tumor progression. *Mol Cell Biol* 21(6): 2203-2212. <https://doi.org/10.1128/mcb.21.6.2203-2212.2001>
- Ip, Y. T. & Davis, R. J. (1998). Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol* 10(2): 205-219.
[https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(98\)80143-9](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(98)80143-9)
- Jose, P. A., Soares-da-Silva, P., Eisner, G. M. & Felder, R. A. (2010). Dopamine and G protein-coupled receptor kinase 4 in the kidney: role in blood pressure regulation. *Biochim Biophys Acta* 1802(12): 1259-1267. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.02.004>

- Kang, W., Choi, D., Roh, J., Jung, Y., Ha, Y., Yang, S. & Park, T. (2023). The Role of Cyclic Adenosine Monophosphate (cAMP) in Modulating Glucocorticoid Receptor Signaling and Its Implications on Glucocorticoid-Related Collagen Loss. *Int J Mol Sci* 24(12) :10180. <https://doi.org/10.3390/ijms241210180>
- Kawashima, K., Fujii, T. & Haas, H. L. (2004). Expression of non-neuronal acetylcholine in lymphocytes and its contribution to the regulation of immune function. *Front Biosci* 9: 2063-2085. <https://doi.org/10.2741/1390>
- Kelkar, C. A., Desai, R. S., Kambadakone, A. & Shetty, S. J. (2013). Multidetector CT and histological features of benign mesenchymoma of the infratemporal space: a rare case report. *Dentomaxillofac Radiol* 42(2): 82002914. <https://doi.org/10.1259/dmfr/82002914>
- Kim, J. I., Ganesan, S., Luo, S. X., Wu, Y. W., Park, E., Huang, E. J., Chen, L. & Ding, J. B. (2015). Aldehyde dehydrogenase 1a1 mediates a GABA synthesis pathway in midbrain dopaminergic neurons. *Science* 350(6256): 102-106. <https://doi.org/10.1126/science.aac4690>
- Knudson, C. M. & Korsmeyer, S. J. (1997). Bcl-2 and Bax function independently to regulate cell death. *Nat Genet* 16(4): 358-363. <https://doi.org/10.1038/ng0897-358>
- Kobayashi, K. & Kumura, H. (2011). Distinct behavior of claudin-3 and -4 around lactation period in mammary alveolus in mice. *Histochem Cell Biol* 136(5): 587-594. <https://doi.org/10.1007/s00418-011-0863-6>
- Kobayashi, K., Matsunaga, K., Tsugami, Y., Wakasa, H. & Nishimura, T. (2021). IL-1 β is a key inflammatory cytokine that weakens lactation-specific tight junctions of mammary epithelial cells. *Exp Cell Res* 409(2): 112938. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2021.112938>
- Kobayashi, K., Omatsu, N., Han, L., Shan-Ni, L. & Nishimura, T. (2022). Early effects of lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* on milk production-related signaling pathways in mouse mammary epithelial cells. *Exp Cell Res* 420(1): 113352. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2022.113352>

- Kobayashi, K., Oyama, S., Kuki, C., Tsugami, Y., Matsunaga, K., Suzuki, T. & Nishimura, T. (2017). Distinct roles of prolactin, epidermal growth factor, and glucocorticoids in β -casein secretion pathway in lactating mammary epithelial cells. *Mol Cell Endocrinol* 440: 16-24.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.11.006>
- Kobayashi, K., Oyama, S., Numata, A., Rahman, M. M. & Kumura, H. (2013). Lipopolysaccharide disrupts the milk-blood barrier by modulating claudins in mammary alveolar tight junctions. *PLoS One* 8(4): e62187. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062187>
- Kobayashi, K., Tsugami, Y., Matsunaga, K., Oyama, S., Kuki, C. & Kumura, H. (2016). Prolactin and glucocorticoid signaling induces lactation-specific tight junctions concurrent with β -casein expression in mammary epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1863(8): 2006-2016.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.04.023>
- Kobayashi, K., Yasui, Y., Uehara, T., Ninomiya, K., Miwa, H. & Han, L. (2025). Nicotinic acetylcholine receptors modulate casein secretion and claudin expression in mammary epithelial cells by regulating STAT5 and Akt pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 770: 152036. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2025.152036>
- Koumangoye, R. (2022). The role of Cl⁽⁻⁾ and K⁽⁺⁾ efflux in NLRP3 inflammasome and innate immune response activation. *Am J Physiol Cell Physiol* 322(4): C645-c652.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00421.2021>
- Lan, J., Wang, J., Wang, S., Wang, J., Huang, S., Wang, Y. & Ma, Y. (2024). The activation of GABA(A)R alleviated cerebral ischemic injury via the suppression of oxidative stress, autophagy, and apoptosis pathways. *Antioxidants (Basel)* 13(2): 194.
<https://doi.org/10.3390/antiox13020194>
- Le Parc, A., Leonil, J. & Chanut, E. (2010). AlphaS1-casein, which is essential for efficient ER-to-Golgi casein transport, is also present in a tightly membrane-associated form. *BMC Cell Biol* 11: 65. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-11-65>

- Leebaw, W. F., Lee, L. A. & Woolf, P. D. (1978). Dopamine affects basal and augmented pituitary hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 47(3): 480-487. <https://doi.org/10.1210/jcem-47-3-480>
- Levavi-Sivan, B., Biran, J. & Fireman, E. (2006). Sex steroids are involved in the regulation of gonadotropin-releasing hormone and dopamine D2 receptors in female tilapia pituitary. *Biol Reprod* 75(4): 642-650. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.051540>
- Li, C., Liu, C., Nissim, I., Chen, J., Chen, P., Doliba, N., Zhang, T., Nissim, I., Daikhin, Y., Stokes, D., Yudkoff, M., Bennett, M. J., Stanley, C. A., Matschinsky, F. M. & Naji, A. (2013). Regulation of glucagon secretion in normal and diabetic human islets by γ -hydroxybutyrate and glycine. *J Biol Chem* 288(6): 3938-3951. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.385682>
- Li, Z., Liu, P., Zhang, H., Zhao, S., Jin, Z., Li, R., Guo, Y. & Wang, X. (2017). Role of GABA(B) receptors and p38MAPK/NF- κ B pathway in paclitaxel-induced apoptosis of hippocampal neurons. *Pharm Biol* 55(1): 2188-2195. <https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1392987>
- Lifantseva, N. V., Koneeva, T. O., Voronezhskaya, E. E. & Melnikova, V. I. (2017). Expression of components of the serotonergic system in the developing rat thymus. *Dokl Biochem Biophys* 477(1): 401-404. <https://doi.org/10.1134/s1607672917060151>
- Lifantseva, N. V., Koneeva, T. O., Voronova, S. N., Zakharova, L. A. & Melnikova, V. I. (2016). The inhibition of dopamine synthesis in fetuses changes the pattern of T-lymphocyte maturation in the thymus of adult rats. *Dokl Biochem Biophys* 470(1): 342-344. <https://doi.org/10.1134/s1607672916050082>
- Linzell, J. L. & Peaker, M. (1971). Intracellular concentrations of sodium, potassium and chloride in the lactating mammary gland and their relation to the secretory mechanism. *J Physiol* 216(3): 683-700. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1971.sp009547>
- Liu, C., Goel, P. & Kaeser, P. S. (2021). Spatial and temporal scales of dopamine transmission. *Nat Rev Neurosci* 22(6): 345-358. <https://doi.org/10.1038/s41583-021-00455-7>

- Liu, L., Lin, Y., Liu, L., Bian, Y., Zhang, L., Gao, X. & Li, Q. (2015). 14-3-3 γ Regulates Lipopolysaccharide-induced inflammatory responses and lactation in dairy cow mammary epithelial cells by inhibiting NF- κ B and MAPKs and up-regulating mTOR signaling. *Int J Mol Sci* 16(7): 16622-16641. <https://doi.org/10.3390/ijms160716622>
- Liu, M., Ren, L., Zhong, X., Ding, Y., Liu, T., Liu, Z., Yang, X., Cui, L., Yang, L., Fan, Y., Liu, Y. & Zhang, Y. (2020). D2-like receptors mediate dopamine-inhibited insulin secretion via ion channels in rat pancreatic β -Cells. *Front Endocrinol (Lausanne)* 11: 152. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00152>
- Lu, J., Zhang, Q., Tan, D., Luo, W., Zhao, H., Ma, J., Liang, H. & Tan, Y. (2016). GABA A receptor π subunit promotes apoptosis of HTR-8/SVneo trophoblastic cells: Implications in preeclampsia. *Int J Mol Med* 38(1): 105-112. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2608>
- Lu, W. Y. & Inman, M. D. (2009). Gamma-aminobutyric acid nurtures allergic asthma. *Clin Exp Allergy* 39(7): 956-961. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2009.03265.x>
- Ma, B. F., Xie, M. J. & Zhou, M. (2012). Bicarbonate efflux via GABA(A) receptors depolarizes membrane potential and inhibits two-pore domain potassium channels of astrocytes in rat hippocampal slices. *Glia* 60(11): 1761-1772. <https://doi.org/10.1002/glia.22395>
- Ma, X., Sun, Q., Sun, X., Chen, D., Wei, C., Yu, X., Liu, C., Li, Y. & Li, J. (2018). Activation of GABA(A) receptors in colon epithelium exacerbates acute colitis. *Front Immunol* 9: 987. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00987>
- Macias, H. & Hinck, L. (2012). Mammary gland development. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 1(4): 533-557. <https://doi.org/10.1002/wdev.35>
- Madan, A. P. & DeFranco, D. B. (1993). Bidirectional transport of glucocorticoid receptors across the nuclear envelope. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(8): 3588-3592. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.8.3588>
- Manning, B. D. & Cantley, L. C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129(7): 1275-1286.

1261-1274. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.009>

Mariano, C., Sasaki, H., Brites, D. & Brito, M. A. (2011). A look at tricellulin and its role in tight junction formation and maintenance. *Eur J Cell Biol* 90(10): 787-796.

<https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2011.06.005>

Matter, K., Aijaz, S., Tsapara, A. & Balda, M. S. (2005). Mammalian tight junctions in the regulation of epithelial differentiation and proliferation. *Curr Opin Cell Biol* 17(5): 453-458.

<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.08.003>

McBurney-Lin, J., Lu, J., Zuo, Y. & Yang, H. (2019). Locus coeruleus-norepinephrine modulation of sensory processing and perception: A focused review. *Neurosci Biobehav Rev* 105: 190-199.

<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.06.009>

McCubrey, J. A., Steelman, L. S., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Wong, E. W., Chang, F., Lehmann, B., Terrian, D. M., Milella, M., Tafuri, A., Stivala, F., Libra, M., Basecke, J., Evangelisti, C., Martelli, A. M. & Franklin, R. A. (2007). Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 1773(8): 1263-1284.

<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.10.001>

McDonnell, T. J., Beham, A., Sarkiss, M., Andersen, M. M. & Lo, P. (1996). Importance of the Bcl-2 family in cell death regulation. *Experientia* 52(10-11): 1008-1017.

<https://doi.org/10.1007/bf01920110>

Ministry of Agriculture, F. a. F., Japan (2021). Review Report:

Broflanilide. https://www.maff.go.jp/j/nouyaku/n_sinsa/attach/pdf/index-64.pdf

Misto, A., Provensi, G., Vozella, V., Passani, M. B. & Piomelli, D. (2019). Mast cell-derived histamine regulates liver ketogenesis via oleoylethanolamide signaling. *Cell Metab* 29(1): 91-102.e105.

<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.09.014>

Narayanan, V., Schappell, L. E., Mayer, C. R., Duke, A. A., Armiger, T. J., Arsenovic, P. T., Mohan, A., Dahl, K. N., Gleghorn, J. P. & Conway, D. E. (2020). Osmotic gradients in epithelial acini

- increase mechanical tension across E-cadherin, drive morphogenesis, and maintain homeostasis. *Curr Biol* 30(4): 624-633. e624. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.12.025>
- Neman, J., Termini, J., Wilczynski, S., Vaidehi, N., Choy, C., Kowolik, C. M., Li, H., Hambrecht, A. C., Roberts, E. & Jandial, R. (2014). Human breast cancer metastases to the brain display GABAergic properties in the neural niche. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(3): 984-989. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322098111>
- Neumann, J., Hofmann, B., Dhein, S. & Gergs, U. (2023). Role of dopamine in the heart in health and disease. *Int J Mol Sci* 24(5): 5.24. <https://doi.org/10.3390/ijms24055042>
- Nilsson, J., Bjursell, G. & Kannius-Janson, M. (2006). Nuclear Jak2 and transcription factor NF1-C2: a novel mechanism of prolactin signaling in mammary epithelial cells. *Mol Cell Biol* 26(15): 5663-5674. <https://doi.org/10.1128/mcb.02095-05>
- Nishimura, R., Kim, H., Matsunaga, S., Hayashi, K., Tamura, H., Sasaki, N. & Takeuchi, A. (1993). Comparison of sedative and analgesic/anesthetic effects induced by medetomidine, acepromazine, azaperone, droperidol and midazolam in laboratory pigs. *J Vet Med Sci* 55(4): 687-690. <https://doi.org/10.1292/jvms.55.687>
- O'Grady, S. M. & Lee, S. Y. (2003). Chloride and potassium channel function in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284(5): L689-700. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00256.2002>
- Obadiah, J., Avidor-Reiss, T., Fishburn, C. S., Carmon, S., Bayewitch, M., Vogel, Z., Fuchs, S. & Levavi-Sivan, B. (1999). Adenylyl cyclase interaction with the D2 dopamine receptor family; differential coupling to Gi, Gz, and Gs. *Cell Mol Neurobiol* 19(5): 653-664. <https://doi.org/10.1023/a:1006988603199>
- Obrietan, K. & van den Pol, A. N. (1997). GABA activity mediating cytosolic Ca²⁺ rises in developing neurons is modulated by cAMP-dependent signal transduction. *J Neurosci* 17(12): 4785-4799. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.17-12-04785.1997>

- Oketch-Rabah, H. A., Madden, E. F., Roe, A. L. & Betz, J. M. (2021). United States Pharmacopeia (USP) safety review of Gamma-Aminobutyric Acid (GABA). *Nutrients* 13(8): 2742.
<https://doi.org/10.3390/nu13082742>
- Olivares-Hernández, A., Figuero-Pérez, L., Cruz-Hernandez, J. J., González Sarmiento, R., Usategui-Martin, R. & Miramontes-González, J. P. (2021). Dopamine receptors and the kidney: An overview of health- and pharmacological-targeted implications. *Biomolecules* 11(2): 254.
<https://doi.org/10.3390/biom11020254>
- Olsen, R. W. (2006). Picrotoxin-like channel blockers of GABA_A receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(16): 6081-6082. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601121103>
- Ong, J. & Kerr, D. I. (1990). GABA-receptors in peripheral tissues. *Life Sci* 46(21): 1489-1501.
[https://doi.org/10.1016/0024-3205\(90\)90421-m](https://doi.org/10.1016/0024-3205(90)90421-m)
- Pace, T. W., Hu, F. & Miller, A. H. (2011). Activation of cAMP-protein kinase A abrogates STAT5-mediated inhibition of glucocorticoid receptor signaling by interferon-alpha. *Brain Behav Immun* 25(8): 1716-1724. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.07.227>
- Pakkhesal, S. (2024). GABA_A receptor modulation by the endocannabinoid system: insights into the regulatory mechanisms involving glutamine synthetase and MAPK mediators. *Hum Cell* 37(6): 1751-1753. <https://doi.org/10.1007/s13577-024-01126-2>
- Palmeri, C. M., Petiti, J. P., Sosa Ldel, V., Gutiérrez, S., De Paul, A. L., Mukdsi, J. H. & Torres, A. I. (2009). Bromocriptine induces paraptosis as the main type of cell death responsible for experimental pituitary tumor shrinkage. *Toxicol Appl Pharmacol* 240(1): 55-65.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.07.002>
- Pauloin, A. & Chanut, E. (2012). Prolactin and epidermal growth factor stimulate adipophilin synthesis in HC11 mouse mammary epithelial cells via the PI3-kinase/Akt/mTOR pathway. *Biochim Biophys Acta* 1823(5): 987-996. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.02.016>
- Pivonello, R., Ferone, D., Lombardi, G., Colao, A., Lamberts, S. W. J. & Hofland, L. J. (2007). Novel

- insights in dopamine receptor physiology. *Eur J Endocrinol* 156 Suppl 1: S13-S21.
<https://doi.org/10.1530/eje.1.02353>
- Promptang, S., Turbpaiboon, C., Oo, E. M., Khawawisetsut, L., Uawithya, P. & Chompoopong, S. (2023). Germinated brown rice protects against glutamate toxicity in HT22 hippocampal neurons through the jnk-mediated apoptotic pathway via the GABA(A) receptor. *IBRO Neurosci Rep* 14: 38-49. <https://doi.org/10.1016/j.ibneur.2022.12.004>
- Raisova, M., Hossini, A. M., Eberle, J., Riebeling, C., Wieder, T., Sturm, I., Daniel, P. T., Orfanos, C. E. & Geilen, C. C. (2001). The Bax/Bcl-2 ratio determines the susceptibility of human melanoma cells to CD95/Fas-mediated apoptosis. *J Invest Dermatol* 117(2): 333-340.
<https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01409.x>
- Reijmen, E., Vannucci, L., De Couck, M., De Grève, J. & Gidron, Y. (2018). Therapeutic potential of the vagus nerve in cancer. *Immunol Lett* 202: 38-43.
<https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.07.006>
- Richardson, J. R., Fitsanakis, V., Westerink, R. H. S. & Kanthasamy, A. G. (2019). Neurotoxicity of pesticides. *Acta Neuropathol* 138(3): 343-362. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-02033-9>
- Rodríguez de Lores, A., Alberici de Canal, M. & De Robertis, E. (1971). 2-Amine 4-pentenoic acid (allylglycine): a proposed tool for the study of GABA mediated systems. *Int J Neurosci* 2(3): 137-144. <https://doi.org/10.3109/00207457109148766>
- Roggero, E., Besedovsky, H. O. & del Rey, A. (2011). The role of the sympathetic nervous system in the thymus in health and disease. *Neuroimmunomodulation* 18(5): 339-349.
<https://doi.org/10.1159/000329581>
- Rohbeck, E., Niersmann, C., Köhrer, K., Wachtmeister, T., Roden, M., Eckel, J. & Romacho, T. (2023). Positive allosteric GABA(A) receptor modulation counteracts lipotoxicity-induced gene expression changes in hepatocytes in vitro. *Front Physiol* 14: 1106075.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1106075>

- Romanò, N., Yip, S. H., Hodson, D. J., Guillou, A., Parnaudeau, S., Kirk, S., Tronche, F., Bonnefont, X., Le Tissier, P., Bunn, S. J., Grattan, D. R., Mollard, P. & Martin, A. O. (2013). Plasticity of hypothalamic dopamine neurons during lactation results in dissociation of electrical activity and release. *J Neurosci* 33(10): 4424-4433. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.4415-12.2013>
- Rowther, F. B., Richardson, A., Clayton, R. N. & Farrell, W. E. (2010). Bromocriptine and dopamine mediate independent and synergistic apoptotic pathways in pituitary cells. *Neuroendocrinology* 91(3): 256-267. <https://doi.org/10.1159/000279753>
- Rubí, B. & Maechler, P. (2010). Minireview: new roles for peripheral dopamine on metabolic control and tumor growth: let's seek the balance. *Endocrinology* 151(12): 5570-5581. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0745>
- Scaltriti, M. & Baselga, J. (2006). The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin Cancer Res* 12(18): 5268-5272. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.Ccr-05-1554>
- Scimemi, A. (2014). Structure, function, and plasticity of GABA transporters. *Front Cell Neurosci* 8: 161. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00161>
- Shao, X., Lee, P. W., Liu, Z., Xu, X., Li, Z. & Qian, X. (2011). cis-Configuration: a new tactic/rationale for neonicotinoid molecular design. *J Agric Food Chem* 59(7): 2943-2949. <https://doi.org/10.1021/jf103499x>
- Sheffler, Z. M., Reddy, V. & Pillarisetty, L. S. (2025). Physiology, Neurotransmitters. In *StatPearls* Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Vamsi Reddy declares no relevant financial relationships with ineligible companies. Disclosure: Leela Sharath Pillarisetty declares no relevant financial relationships with ineligible companies.: StatPearls Publishing. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539894/>
- Sheppard, D. N. & Welsh, M. J. (1999). Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev* 79(1 Suppl): S23-45. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.1.S23>
- Shin, K., Fogg, V. C. & Margolis, B. (2006). Tight junctions and cell polarity. *Annu Rev Cell Dev Biol*

22: 207-235. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104219>

Shipman, M., Lubick, K., Fouchard, D., Guram, R., Grieco, P., Jutila, M. & Dratz, E. A. (2012).

Proteomic and systems biology analysis of monocytes exposed to securinine, a GABA(A) receptor antagonist and immune adjuvant. *PLoS One* 7(9): e41278.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041278>

Shyamala, G. (1973). Specific cytoplasmic glucocorticoid hormone receptors in lactating mammary

glands. *Biochemistry* 12(16): 3085-3090. <https://doi.org/10.1021/bi00740a022>

Sibley, D. R. & Monsma, F. J., Jr. (1992). Molecular biology of dopamine receptors. *Trends Pharmacol*

Sci 13(2): 61-69. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(92\)90025-2](https://doi.org/10.1016/0165-6147(92)90025-2)

Sieghart, W. (1992). GABAA receptors: ligand-gated Cl⁻ ion channels modulated by multiple drug-

binding sites. *Trends Pharmacol Sci* 13(12): 446-450. [https://doi.org/10.1016/0165-](https://doi.org/10.1016/0165-6147(92)90142-s)

[6147\(92\)90142-s](https://doi.org/10.1016/0165-6147(92)90142-s)

Sieghart, W. (2015). Allosteric modulation of GABA_A receptors via multiple drug-binding sites. *Adv*

Pharmacol 72: 53-96. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2014.10.002>

Sigel, E. & Steinmann, M. E. (2012). Structure, function, and modulation of GABA(A) receptors. *J*

Biol Chem 287(48): 40224-40231. <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.386664>

Sizemore, G. M., Sizemore, S. T., Seachrist, D. D. & Keri, R. A. (2014). GABA(A) receptor pi

(GABRP) stimulates basal-like breast cancer cell migration through activation of

extracellular-regulated kinase 1/2 (ERK1/2). *J Biol Chem* 289(35): 24102-24113.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.593582>

Smith, J. L., Stein, D. A., Shum, D., Fischer, M. A., Radu, C., Bhinder, B., Djaballah, H., Nelson, J. A.,

Früh, K. & Hirsch, A. J. (2014). Inhibition of dengue virus replication by a class of small-

molecule compounds that antagonize dopamine receptor d4 and downstream mitogen-

activated protein kinase signaling. *J Virol* 88(10): 5533-5542.

<https://doi.org/10.1128/jvi.00365-14>

- Soltani, N., Qiu, H., Aleksic, M., Glinka, Y., Zhao, F., Liu, R., Li, Y., Zhang, N., Chakrabarti, R., Ng, T., Jin, T., Zhang, H., Lu, W. Y., Feng, Z. P., Prud'homme, G. J. & Wang, Q. (2011). GABA exerts protective and regenerative effects on islet beta cells and reverses diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(28): 11692-11697. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102715108>
- Spohn, S. N. & Mawe, G. M. (2017). Non-conventional features of peripheral serotonin signalling - the gut and beyond. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 14(7): 412-420. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.51>
- Stein, V. & Nicoll, R. A. (2003). GABA generates excitement. *Neuron* 37(3): 375-378. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00056-4](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00056-4)
- Stelwagen, K. & Singh, K. (2014). The role of tight junctions in mammary gland function. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 19(1): 131-138. <https://doi.org/10.1007/s10911-013-9309-1>
- Stöcklin, E., Wissler, M., Gouilleux, F. & Groner, B. (1996). Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor. *Nature* 383(6602): 726-728. <https://doi.org/10.1038/383726a0>
- Stull, M. A., Pai, V., Vomachka, A. J., Marshall, A. M., Jacob, G. A. & Horseman, N. D. (2007). Mammary gland homeostasis employs serotonergic regulation of epithelial tight junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(42): 16708-16713. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708136104>
- Sugawara, T., Furuse, K., Otani, T., Wakayama, T. & Furuse, M. (2021). Angulin-1 seals tricellular contacts independently of tricellulin and claudins. *J Cell Biol* 220(9): e202005062. <https://doi.org/10.1083/jcb.202005062>
- Sultatos, L. G. (1994). Mammalian toxicology of organophosphorus pesticides. *J Toxicol Environ Health* 43(3): 271-289. <https://doi.org/10.1080/15287399409531921>
- Sun, Y., Liu, W. Z., Liu, T., Feng, X., Yang, N. & Zhou, H. F. (2015). Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. *J Recept Signal Transduct Res* 35(6): 600-604. <https://doi.org/10.3109/10799893.2015.1030412>
- Sung, E., Park, J., Lee, H., Song, G. & Lim, W. (2023). Bifenthrin induces cell death in bovine

- mammary epithelial cells via ROS generation, calcium ion homeostasis disruption, and MAPK signaling cascade alteration. *Pestic Biochem Physiol* 196: 105637.
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2023.105637>
- Takehara, A., Hosokawa, M., Eguchi, H., Ohigashi, H., Ishikawa, O., Nakamura, Y. & Nakagawa, H. (2007). Gamma-aminobutyric acid (GABA) stimulates pancreatic cancer growth through overexpressing GABAA receptor $\alpha 1$ subunit. *Cancer Res* 67(20): 9704-9712.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-07-2099>
- Tanaka, C. (1985). gamma-Aminobutyric acid in peripheral tissues. *Life Sci* 37(24): 2221-2235.
[https://doi.org/10.1016/0024-3205\(85\)90013-x](https://doi.org/10.1016/0024-3205(85)90013-x)
- Tang, C., Sun, R., Wen, G., Zhong, C., Yang, J., Zhu, J., Cong, Z., Luo, X. & Ma, C. (2019). Bromocriptine and cabergoline induce cell death in prolactinoma cells via the ERK/EGR1 and AKT/mTOR pathway respectively. *Cell Death Dis* 10(5): 335. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1526-0>
- Tavares, G., Martins, F. O., Melo, B. F., Matafome, P. & Conde, S. V. (2021). Peripheral dopamine directly acts on insulin-sensitive tissues to regulate insulin signaling and metabolic function. *Front Pharmacol* 12: 713418. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.713418>
- Teh, J. L., Shah, R., La Cava, S., Dolfi, S. C., Mehta, M. S., Kongara, S., Price, S., Ganesan, S., Reuhl, K. R., Hirshfield, K. M., Karantza, V. & Chen, S. (2015). Metabotropic glutamate receptor 1 disrupts mammary acinar architecture and initiates malignant transformation of mammary epithelial cells. *Breast Cancer Res Treat* 151(1): 57-73. <https://doi.org/10.1007/s10549-015-3365-8>
- Tian, M., Qi, Y., Zhang, X., Wu, Z., Chen, J., Chen, F., Guan, W. & Zhang, S. (2020). Regulation of the JAK2-STAT5 pathway by signaling molecules in the mammary gland. *Front Cell Dev Biol* 8: 604896. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.604896>
- Torres, S. R., Fröde, T. S., Nardi, G. M., Vita, N., Reeb, R., Ferrara, P., Ribeiro-do-Valle, R. M. &

- Farges, R. C. (2000). Anti-inflammatory effects of peripheral benzodiazepine receptor ligands in two mouse models of inflammation. *Eur J Pharmacol* 408(2): 199-211.
[https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(00\)00760-3](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(00)00760-3)
- Truchet, S., Chat, S. & Ollivier-Bousquet, M. (2014). Milk secretion: The role of SNARE proteins. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 19(1): 119-130. <https://doi.org/10.1007/s10911-013-9311-7>
- Tsao, C. W., Lin, Y. S. & Cheng, J. T. (1997). Effect of dopamine on immune cell proliferation in mice. *Life Sci* 61(24): P1 361-371. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(97\)00962-4](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(97)00962-4)
- Uefune, F., Aonishi, T., Kitaguchi, T., Takahashi, H., Seino, S., Sakano, D. & Kume, S. (2022). Dopamine negatively regulates insulin secretion through activation of D1-D2 receptor heteromer. *Diabetes* 71(9): 1946-1961. <https://doi.org/10.2337/db21-0644>
- Ulyanova, T., Scott, L. M., Priestley, G. V., Jiang, Y., Nakamoto, B., Koni, P. A. & Papayannopoulou, T. (2005). VCAM-1 expression in adult hematopoietic and nonhematopoietic cells is controlled by tissue-inductive signals and reflects their developmental origin. *Blood* 106(1): 86-94.
<https://doi.org/10.1182/blood-2004-09-3417>
- Untereiner, A., Abdo, S., Bhattacharjee, A., Gohil, H., Pourasgari, F., Ibeh, N., Lai, M., Batchuluun, B., Wong, A., Khuu, N., Liu, Y., Al Rijjal, D., Winegarden, N., Virtanen, C., Orser, B. A., Cabrera, O., Varga, G., Rocheleau, J., Dai, F. F. & Wheeler, M. B. (2019). GABA promotes β -cell proliferation, but does not overcome impaired glucose homeostasis associated with diet-induced obesity. *Faseb J* 33(3): 3968-3984. <https://doi.org/10.1096/fj.201801397R>
- Untereiner, A., Xu, J., Bhattacharjee, A., Cabrera, O., Hu, C., Dai, F. F. & Wheeler, M. B. (2020). γ -aminobutyric acid stimulates β -cell proliferation through the mTORC1/p70S6K pathway, an effect amplified by Ly49, a novel γ -aminobutyric acid type A receptor positive allosteric modulator. *Diabetes Obes Metab* 22(11): 2021-2031. <https://doi.org/10.1111/dom.14118>
- Vanklompenberg, M. K., Manjarin, R., Trott, J. F., McMicking, H. F. & Hovey, R. C. (2013). Late gestational hyperprolactinemia accelerates mammary epithelial cell differentiation that leads

- to increased milk yield. *J Anim Sci* 91(3): 1102-1111. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5903>
- Vázquez-Carrillo, D. I., Ocampo-Ruiz, A. L., Báez-Meza, A., Ramírez-Hernández, G., Adán-Castro, E., García-Rodrigo, J. F., Dena-Beltrán, J. L., de Los Ríos, E. A., Sánchez-Martínez, M. K., Ortiz, M. G., Martínez de la Escalera, G., Clapp, C. & Macotela, Y. (2024). Dopamine D2 receptor antagonist counteracts hyperglycemia and insulin resistance in diet-induced obese male mice. *PLoS One* 19(4): e0301496. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0301496>
- Verkman, A. S., Sellers, M. C., Chao, A. C., Leung, T. & Ketcham, R. (1989). Synthesis and characterization of improved chloride-sensitive fluorescent indicators for biological applications. *Anal Biochem* 178(2): 355-361. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90652-0](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90652-0)
- Wan, Y., Wang, Q. & Prud'homme, G. J. (2015). GABAergic system in the endocrine pancreas: a new target for diabetes treatment. *Diabetes Metab Syndr Obes* 8: 79-87. <https://doi.org/10.2147/dmso.S50642>
- Wang, D. M., Chacher, B., Liu, H. Y., Wang, J. K., Lin, J. & Liu, J. X. (2015). Effects of γ -aminobutyric acid on feed intake, growth performance and expression of related genes in growing lambs. *Animal* 9(3): 445-448. <https://doi.org/10.1017/s1751731114002651>
- Wang, J. K., Morgan, J. I. & Spector, S. (1984). Benzodiazepines that bind at peripheral sites inhibit cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(3): 753-756. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.3.753>
- Wang, K., Che, W., Duan, M., Wang, C., Li, X. & He, L. (2023). Effects of broflanilide on oxidative stress and expression of apoptotic genes in zebrafish (*Danio rerio*) gill. *Bull Environ Contam Toxicol* 110(5): 91. <https://doi.org/10.1007/s00128-023-03733-5>
- Wang, L. L., Ou, C. C. & Chan, J. Y. (2005). Receptor-independent activation of GABAergic neurotransmission and receptor-dependent nontranscriptional activation of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt pathway in short-term cardiovascular actions of dexamethasone at the nucleus tractus solitarii of the rat. *Mol Pharmacol* 67(2): 489-498.

<https://doi.org/10.1124/mol.104.005595>

- Wellnitz, O. & Bruckmaier, R. M. (2021). Invited review: The role of the blood-milk barrier and its manipulation for the efficacy of the mammary immune response and milk production. *J Dairy Sci* 104(6): 6376-6388. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-20029>
- Wen, H. C., Avivar-Valderas, A., Sosa, M. S., Girnius, N., Farias, E. F., Davis, R. J. & Aguirre-Ghiso, J. A. (2011). p38 α signaling induces anoikis and lumen formation during mammary morphogenesis. *Sci Signal* 4(174): ra34. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2001684>
- Whyte, J., Bergin, O., Bianchi, A., McNally, S. & Martin, F. (2009). Key signalling nodes in mammary gland development and cancer. Mitogen-activated protein kinase signalling in experimental models of breast cancer progression and in mammary gland development. *Breast Cancer Res* 11(5): 209. <https://doi.org/10.1186/bcr2361>
- Wise, A., Green, A., Main, M. J., Wilson, R., Fraser, N. & Marshall, F. H. (1999). Calcium sensing properties of the GABA(B) receptor. *Neuropharmacology* 38(11): 1647-1656. [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(99\)00119-7](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(99)00119-7)
- Wu, X. Y., Zhang, C. X., Deng, L. C., Xiao, J., Yuan, X., Zhang, B., Hou, Z. B., Sheng, Z. H., Sun, L., Jiang, Q. C. & Zhao, W. (2018). Overexpressed D2 dopamine receptor inhibits Non-small cell lung cancer progression through inhibiting NF- κ B signaling pathway. *Cell Physiol Biochem* 48(6): 2258-2272. <https://doi.org/10.1159/000492644>
- Wyszomierski, S. L., Yeh, J. & Rosen, J. M. (1999). Glucocorticoid receptor/signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) interactions enhance STAT5 activation by prolonging STAT5 DNA binding and tyrosine phosphorylation. *Mol Endocrinol* 13(2): 330-343. <https://doi.org/10.1210/mend.13.2.0232>
- Xu, J., Li, C., Yin, X. H. & Zhang, G. Y. (2008). Additive neuroprotection of GABA_A and GABA_B receptor agonists in cerebral ischemic injury via PI-3K/Akt pathway inhibiting the ASK1-JNK cascade. *Neuropharmacology* 54(7): 1029-1040.

<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.01.014>

Xu, W., Cormier, R., Fu, T., Covey, D. F., Isenberg, K. E., Zorumski, C. F. & Mennerick, S. (2000).

Slow death of postnatal hippocampal neurons by GABA(A) receptor overactivation. *J*

Neurosci 20(9): 3147-3156. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-09-03147.2000>

Yamada, J., Okabe, A., Toyoda, H., Kilb, W., Luhmann, H. J. & Fukuda, A. (2004). Cl⁻ uptake

promoting depolarizing GABA actions in immature rat neocortical neurones is mediated by

NKCC1. *J Physiol* 557(Pt 3): 829-841. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.062471>

Yang, H., Huang, L. Y., Zeng, D. Y., Huang, E. W., Liang, S. J., Tang, Y. B., Su, Y. X., Tao, J., Shang,

F., Wu, Q. Q., Xiong, L. X., Lv, X. F., Liu, J., Guan, Y. Y. & Zhou, J. G. (2012). Decrease of

intracellular chloride concentration promotes endothelial cell inflammation by activating

nuclear factor- κ B pathway. *Hypertension* 60(5): 1287-1293.

<https://doi.org/10.1161/hypertensionaha.112.198648>

Yang, Y., Li, X., Wang, Y., Wang, J., Liu, G., Geng, Z., Wu, R., Lian, S. & Wang, J. (2025). Estrogen

and glucocorticoid promote the lactoferrin synthesis and secretion ability of bovine mammary

epithelial cells through ER and GR signaling pathways. *Int J Biol Macromol* 307(Pt 1):

140636. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.140636>

Yu, H., Pardoll, D. & Jove, R. (2009). STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for

STAT3. *Nat Rev Cancer* 9(11): 798-809. <https://doi.org/10.1038/nrc2734>

Yu, J. S. & Cui, W. (2016). Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR

signalling in pluripotency and cell fate determination. *Development* 143(17): 3050-3060.

<https://doi.org/10.1242/dev.137075>

Zhan, E. L., Wang, Y., Jiang, J., Jia, Z. Q., Tang, T., Song, Z. J., Han, Z. J. & Zhao, C. Q. (2021).

Influence of three insecticides targeting GABA receptor on fall armyworm *Spodoptera*

frugiperda: Analyses from individual, biochemical and molecular levels. *Pestic Biochem*

Physiol 179: 104973. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2021.104973>

- Zhang, D., Li, X., Yao, Z., Wei, C., Ning, N. & Li, J. (2014). GABAergic signaling facilitates breast cancer metastasis by promoting ERK1/2-dependent phosphorylation. *Cancer Lett* 348(1-2): 100-108. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.03.006>
- Zhang, F., Li, C., Wang, R., Han, D., Zhang, Q. G., Zhou, C., Yu, H. M. & Zhang, G. Y. (2007). Activation of GABA receptors attenuates neuronal apoptosis through inhibiting the tyrosine phosphorylation of NR2A by Src after cerebral ischemia and reperfusion. *Neuroscience* 150(4): 938-949. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.09.070>
- Zhang, Y., Ren, H., Lu, X., He, D., Han, Y., Wang, H., Zeng, C. & Shi, W. (2016). Inhibition of D4 dopamine receptors on insulin receptor expression and effect in renal proximal tubule cells. *J Am Heart Assoc* 5(4). <https://doi.org/10.1161/jaha.115.002448>
- Zheng, J., Ather, J. L., Sonstegard, T. S. & Kerr, D. E. (2005). Characterization of the infection-responsive bovine lactoferrin promoter. *Gene* 353(1): 107-117. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.04.016>