

学位論文要旨

学位申請者氏名 千葉 健史

出産後の女性は、ホルモンバランスの崩れや生活環境の変化からしばしば精神障害を発症することが報告されている。特に、産後うつ病の発症率は10~15%とされており、この時期におけるうつ病の悪化は、母親と子供間の絆の低下、母親の自殺、育児放棄等を引き起こし、乳幼児の神経発達にも影響を及ぼすことから、十分な治療およびケアが不可欠とされている。抗うつ薬の選択的セロトニン再取り込み阻害剤 (SSRIs) は、他の抗うつ剤に比べて副作用が少なく、有効性も高いという利点から、欧米では産後うつ病治療の第一選択薬として使用されている。しかしながら、近年、SSRIs の一つであるフルオキセチンがマウス乳腺の授乳期機能を抑制することが報告されており、SSRIs を服用した母親では、適切な母乳育児が遂行されない可能性も示唆されているが、その詳細なメカニズムは分かっていない。

乳腺は、妊娠期、授乳期、および退縮期の過程で、機能的特徴を大きく変化させる組織であることが分かっている。特に、母乳産生を担う乳腺上皮細胞は、妊娠中に急激に増殖し、種々ホルモンの作用によって著しい機能発達を遂げ、授乳期には母乳産生機能を獲得する。下垂体前葉ホルモンであるプロラクチン (PRL) は、母乳産生を正に制御する生体内物質であり、授乳期乳腺上皮細胞による母乳タンパク質の合成を促進させることが分かっている。乳腺上皮細胞が産生する母乳タンパクの制御機構については、これまで解析が進められており、特に、乳腺の授乳期機能の指標とされる β -カゼインの発現には、PRL 受容体を介した Janus kinase2/signal transducer and activator transcription 5 (Jak2/STAT5) シグナル伝達系が寄与していることが報告されている。さらに、近年、母乳産生を抑制的に制御する生理活性物質が明らかにされ、セロトニン (5-HT) がその役割を担っていることが報告された。授乳期の乳腺上皮細胞は、母乳とともに、5-HT 合成を活発にし、母乳中へ分泌しており、母乳中の 5-HT が母乳産生制御に関与していることが分かっている。また、マウスやウシの乳腺上皮細胞を用いた研究において、5-HT が β -カゼインの発現を抑制することも報告されているが、その抑制メカニズムの詳細は分かっていない。SSRIs は 5-HT を介した作用機序を有する薬物であることから、SSRI の授乳期機能に対する影響を評価するためには、母乳産生における 5-HT の制御メカニズムについて検討を行う必要があると考えられる。

申請者は、SSRIsによる母乳産生抑制メカニズムを解明することを目的に、第1章では、種々評価に用いるためのヒト細胞培養系の特性について検討を行った。また、第2章では、5-HTによる β -カゼイン発現の制御メカニズムを検討するため、 β -カゼイン発現の抑制に関与する5-HT受容体の同定を行った。さらに、第3章では本邦で汎用されているSSRIsの β -カゼイン発現に対する影響を評価するとともに、その抑制メカニズムの解明を行った。

第1章では、ヒト正常組織由来の不死化細胞であるMCF-12Aを用いた培養系の特性について検討を行った。MCF-12Aの β -カゼインおよびリン酸化STAT5の発現量は、PRLの添加濃度に依存して増加し、5-HTの添加濃度に依存して減少するという結果が得られた。さらに、MCF-12Aには、5-HTトランスポーター (SERT) や、乳腺における5-HT合成に関与するトリプトファン水酸化酵素 (TPH1) の発現も確認され、細胞内で合成された5-HTの細胞外への分泌も確認された。これらの結果は、MCF-12Aを用いた実験系が、母乳産生に影響を及ぼすことが知られている生理活性物質 (PRLおよび5-HT) に対する応答性と5-HT制御機構を有していることを示しており、これらのことから、MCF-12Aを用いた培養系は、SSRIsの母乳産生機能に対

する影響を評価できる培養系として有用であると考えられた。

次に、第2章では、5-HTによる β -カゼイン発現の抑制メカニズムについて検討を行うため、その抑制に関与する5-HT受容体の同定を行った。ヒト乳腺上皮細胞には、既に4種類の5-HT受容体(5-HTR_{1D}, 2A, 3B, 7)の発現が確認されているため、本章では、まず始めに、MCF-12Aにおける4つの受容体発現について評価を行った。その結果、MCF-12Aには、4つの受容体すべての発現が認められ、いずれの発現量もPRL処理により誘導された。また、4つの受容体の内、他の2つの受容体に比べて発現量が高かった5-HTR_{1D}および5-HTR₇について、5-HTによる β -カゼイン発現の抑制への関与について検討した。MCF-12Aにおける5-HTによる β -カゼインおよびpSTAT5/STAT5レベルの減少は、5-HTR_{1D}の特異的阻害剤であるBRL15572の併用処理により抑制されなかったが、5-HTR₇の特異的阻害剤であるSB269970処理により阻害された。これらの結果から、MCF-12Aにおける5-HTの β -カゼインの発現抑制には、5-HTR₇が関与していることが明らかとなった。

最後に、第3章では、SSRIsによる β -カゼイン発現の抑制メカニズムについて検討を行った。まず始めに、日本で汎用されている3つSSRIs(フルボキサミンマレイン酸塩、パロキセチン塩酸塩、セルトラリン塩酸塩)の β -カゼイン発現に対する影響について評価した。3つのSSRIsは、いずれもMCF-12Aの β -カゼイン発現を抑制した。そこで、申請者は、フルボキサミンマレイン酸塩(FLV)のみに着目し、FLVの β -カゼイン発現の抑制メカニズムについて検討を行った。FLVで単独処理された細胞における β -カゼインおよびpSTAT5/STAT5レベルは、コントロールの値に比べて大きく減少した。また、FLVとSB269970で併用処理された細胞における β -カゼインの発現量は、FLVで単独処理された細胞の値に比べて高い傾向を示したものの、SB269970で単独処理された細胞の値よりも低い傾向を示した。これらの結果は、FLVによる β -カゼインの発現抑制には、内因性セロトニンの作用とは別の作用メカニズムが大きく関与している可能性を示している。続いて申請者は、FLVの別の作用メカニズムとして、SSRIsの小胞体ストレス誘導作用に着目し、本実験系において、FLVが小胞体ストレスを誘導しているのかどうかを評価した。FLVで単独処理された細胞のTPH1およびSERTの発現量は、未処理の細胞の値に比べて同等であったが、小胞体ストレスマーカーであるGRP78/BiPの発現量は有意に増加した。この結果から、FLVが本実験系において小胞体ストレスを誘導していることが明らかとなった。さらに、その小胞体ストレスの誘導が、 β -カゼインの発現に影響を及ぼすのかを検討するため、小胞体ストレスの誘導剤であるツニカマイシンを用い、 β -カゼイン、pSTAT5、STAT5、TPH1、SERT、およびGRP78/BiPの発現変動について検討を行った。その結果、ツニカマイシンで処理された細胞におけるTPH1およびSERTの発現量は、未処理の細胞に比べて変化は認められなかったが、 β -カゼインの発現量とpSTAT5/STAT5レベルは大きく減少し、逆に、GRP78/BiPの発現量は大きく増加した。これらの結果は、FLVで単独処理された細胞の現象と一致していることから、FLVによる β -カゼイン発現の抑制には、小胞体ストレス誘導が関与していることが示唆された。以上の結果から、FLVによる β -カゼイン発現の抑制には、小胞体ストレス作用が大きく関与しており、FLVはSTAT5のリン酸化を阻害して β -カゼインの発現を抑制することが明らかとなった。

本研究では、SSRIsのような小胞体ストレスを誘導するような医薬品が、乳腺機能を抑制する可能性があることを見出した。今後、本研究の成果を臨床現場へフィードバックするためには、SSRIsを服用した授乳婦の母乳成分等の分析を行い、分泌型IgA等の母乳タンパク質や脂質等の乳児に必須な成分の解析を行う等、さらに研究を進めていく必要があると考えられる。

[Title] Selective Serotonin Reuptake Inhibitors Inhibit the Expression of Breast Milk Proteins in Human Mammary Epithelial Cells

[Author] Takeshi Chiba

[Abstract]

Various reports suggest that women experience hormonal imbalance or repeated psychiatric disorders owing to changes in their environment after giving birth. Because the incidence of post-partum depression is 10–15%, proper treatment or care for patients with this disorder is critical; worsening of depression during this period can weaken the bond between mother and child, lead to maternal suicide, or result in child neglect. These outcomes can affect the infant's neural development. Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) are used as the primary drug of choice in Western countries for the treatment of post-partum depression owing to advantages such as fewer adverse drug reactions and higher efficacy than other antidepressants. However, in recent years, it has been reported that fluoxetine, a type of SSRI, inhibits lactation. Although this suggests that mothers administered SSRIs may not be able to adequately breastfeed, the precise mechanism has not been elucidated.

Mammary glands are tissues that functionally undergo major changes during gestation, lactation, and involution. Specifically, mammary epithelial cells that produce milk, rapidly multiply, with significant functional development through interaction with various hormones and acquire the ability to produce milk during the lactation period. The anterior pituitary hormone, prolactin (PRL), is known to positively regulate milk production and facilitate the synthesis of breast milk proteins in the lactating mammary epithelial cells. Various analyses have been conducted on the control mechanism of breast milk proteins produced by mammary epithelial cells. Specifically, it has been reported that the PRL receptor-mediated Janus kinase2/signal transducer and activator transcription 5 (Jak2/STAT5) signaling cascade contributes to the expression of β -casein, which is the marker for lactation in mammary glands. In recent years, a biologically active substance that suppresses breast milk production has been reported, and reports have suggested that serotonin (5-HT) may be a causative factor. Mammary epithelial cells during lactation activate 5-HT synthesis as well as production of breast milk, causing secretion of 5-HT into the breast milk; 5-HT in the breast milk aids in the regulation of breast milk production. In addition, although studies using mammary epithelial cells of mice and cows reported that 5-HT inhibits the expression of β -casein, the control mechanism has not been elucidated. Therefore, it is necessary to examine the control mechanism of 5-HT in breast milk production to evaluate its influence on the lactation function of SSRI, since the action mechanism of SSRIs is mediated by 5-HT.

In chapter 1, an author examined the benefits of a cultivation system with MCF-12A, which are immortalized cells derived from normal tissue of human origin. The results showed that the expression levels of β -casein and phosphorylated STAT5 in MCF-12A increased depending on the additive concentration of PRL and decreased depending on the additive concentration of 5-HT. In MCF-12A cells, the author confirmed the expression of tryptophan hydroxylase (TPH1), which contributes to 5-HT transporter (SERT) or 5-HT synthesis, in mammary glands and confirmed the release of the synthesized 5-HT. As a result, the experimental system using MCF-12A showed the existence of a 5-HT control mechanism and demonstrated the response to biologically active substances (PRL and 5-HT) known to affect breast milk production. Therefore, the author considered a cultivation system that uses MCF-12A that can evaluate the effect of SSRIs on breast milk production.

In chapter 2, the author identified 5-HT receptors that contribute to the regulation of β -casein by 5-HT in order to examine its control mechanism. In this chapter, the author first evaluated the expression of four 5-HT receptor subtypes in MCF-12A (5-HTR_{1D, 2A 3B, 7}), in order to confirm their expression in human mammary epithelial cells. The results showed the expression of all four receptors in MCF-12A and that the expression level of each one was induced by PRL treatment. The author also examined whether 5-HTR_{1D} and 5-HTR₇, which have higher expression levels than the other two receptors, contribute to the regulation of β -casein expression by 5-HT. The reduction of β -casein and pSTAT5/STAT5 levels by 5-HT in MCF-12A was not regulated by co-treatment with the 5-HTR_{1D} inhibitor, BRL15572. Instead, inhibition occurred in response to treatment with the 5-HTR₇ inhibitor, SB269970. These results clarify that 5-HTR₇ contributes to the suppression of β -casein expression by 5-HT in MCF-12A.

In chapter 3, the author examined the control mechanism of β -casein by SSRI. First, the author evaluated the effect of three SSRIs commonly used in Japan (fluvoxamine maleate, paroxetine hydrochloride, and sertraline hydrochloride) on β -casein expression. Each of these three SSRIs suppressed β -casein expression in MCF-12A. Here, the author focused only on fluvoxamine maleate (FLV) and examined the control mechanism of FLV for β -casein expression. The β -casein and pSTAT5/STAT5 levels in cells independently treated with FLV significantly decreased compared to the control value. In addition, although the expression level of β -casein in cells co-treated with FLV and SB269970 was higher than that in cells independently treated with FLV, it showed a tendency to be lower than the value in cells individually treated with SB269970. These results suggest that the mechanism of action different from endogenous serotonin action may greatly contribute to the suppression of β -casein expression by FLV. Subsequently, the author focused on the endoplasmic reticulum stress inductive action of SSRIs as the mechanism of action different from FLV and evaluated whether FLV induces endoplasmic reticulum stress in the experimental system in this study. The expression levels of TPH1 and SERT in cells individually treated with FLV were comparable to the value of untreated cells; however, the expression level of the endoplasmic reticulum stress marker, glucose-related protein 78/binding immunoglobulin (GRP78/BiP), significantly increased. The results clarified that FLV induces endoplasmic reticulum stress in the experimental system of this study. Furthermore, the author examined the variation in β -casein, pSTAT5, STAT5, TPH1, SERT, and GRP78/BiP expression by using the endoplasmic reticulum stress-inducing drug, tunicamycin, to examine whether the induction of endoplasmic reticulum stress affects β -casein expression. Although the results did not show a change in the expression of TPH1 and SERT in cells treated with tunicamycin, the expression level of β -casein and pSTAT5/STAT5 significantly decreased, and conversely, the expression level of GRP78/BiP significantly increased. These results are consistent with behavior of cells individually treated with FLV and suggest that endoplasmic reticulum stress induction contributes to the suppression of β -casein expression by FLV. The results clarify that endoplasmic reticulum stress action greatly contributes to the suppression of β -casein expression by FLV and that FLV inhibits STAT5 phosphorylation and suppresses β -casein expression.

This study found that pharmaceutical products that induce endoplasmic reticulum stress similar to SSRIs could possibly suppress lactation. The author deems it necessary to analyze breast milk components in lactating women administered SSRIs, to analyze breast milk proteins such as secretory IgA or essential components for suckling infants such as fat, and to conduct further studies to provide feedback to the clinical site, in the future.

論文審査の結果の要旨

母乳育児は、母子ともに多くの利点を有している。母乳は、人工乳と比べて栄養学的に優れたものとして乳児に対してその重要性を疑う余地はない。一方、母親に対しては、母乳育児が分娩後のうつ予防効果をもたらす、卵巣がんや骨粗鬆症の発症リスクを低減させるといった疫学調査が示されている。しかし、出産後の女性は、ホルモンバランスの乱れや生活環境の変化などから、少なからず精神障害を発症することが報告されている。特に、産後うつ病の発症率は10~15%とされ、その症状の悪化は、母子間の絆の低下、母親の自殺、育児放棄などの原因となり、結果的に乳幼児の神経発達にも影響を及ぼすことが指摘されている。

うつ病に汎用される抗うつ薬の選択的セロトニン再取り込み阻害剤 (SSRI) は、高い有効性と副作用が少ないなどの利点から、欧米では産後うつ病治療の第一選択薬とされている。しかし、近年動物実験レベルで SSRI に乳腺の母乳産生抑制作用が報告されたことから、服用を続けることで適切な母乳育児が遂行されない可能性が懸念されている。

そこで、本論文では、授乳期の機能指標とされる β -カゼインの発現に対する SSRI の機能を解明するために、第1章ではヒト細胞培養系の有用性を検討し、第2章ではセロトニン (5-HT) による β -カゼインの発現に与える影響を 5-HT 受容体 (5-HTR) の機能から検討している。第3章では、SSRI の β -カゼイン発現に対する影響を評価すると同時にそのメカニズムの解明を試み、以下の結果を得ている。

第1章では、2章以降で実施する生物学的な評価に、ヒト乳腺上皮細胞株 (MCF-12A) が有効か否かを判定している。まず、 β -カゼインの発現を母乳産生機能の指標として、母乳産生制御に関与するプロラクチン (PRL) および 5-HT に対する応答性を検討した。その結果、PRL の処理時間にもよって、PRL 受容体 (PRLR) および β -カゼインの mRNA 量ならびに β -カゼインの発現がタンパク質レベルで誘導され、本培養系が PRL に対して応答性を有していることを明らかにしている。続いて、この細胞に 5-HT を介した β -カゼイン産生制御機構が存在するかを確認するために、5-HT トランスポーター (SERT) の発現と 5-HT 合成能を評価した結果、PRL 処理によって 5-HT 合成酵素のトリプトファン水酸化酵素 1 (TPH1) および SERT の発現が有意に上昇し、さらに PRLR によるシグナル伝達下流の janus kinase 2/signal transduction activator transcription 5 (Jak2/STAT5) 系が関与して細胞内外の 5-HT が増加することを認めている。これらの結果から、本培養系における MCF-12A には、5-HT 合成能があり、さらに細胞内で合成された 5-HT が細胞外に分泌されていることから、5-HT を介した制御機構を調査する上で相応しい *in vitro* 系と考えられた。したがって、MCF-12A を用いることは 5-HT を介した母乳産生機能の評価できるものと考えられ、SSRI の影響を評価可能な系であると結論付けた。

第2章では、MCF-12A に発現する 5-HT 受容体分子種を同定したうえで、 β -カゼインの発現に関与する受容体を同定するとともにその機能を検討した。その結果、調査した4分子のうち PRL 処理によって 5-HTR_{1D} と 5-HTR₇ が遺伝子発現およびタンパク質レベルで有意に増加することを見出している。さらに、これら受容体に対する選択的阻害剤を用いて

β -カゼインの発現に与える影響とシグナル伝達系としての Jak2/STAT5 系の活性化に関する受容体分子種を探索したところ、5-HTR₇が機能分子であることが明らかになった。したがって、5-HT による β -カゼイン産生抑制作用は、5-HTR₇を介したシグナル伝達の抑制によるものであると結論付けた。

第3章では、3種類の SSRI（フルボキサミンマレイン酸塩（FLV）、パロキセチン塩酸塩（PRX）、セルトラリン（SRT））を用いて、 β -カゼインの発現に与える影響とともに内因性 5-HT によるシグナル伝達系を介した小胞体ストレス誘導作用について評価している。まず、3種類の SSRI すべてが、 β -カゼインの発現をタンパク質レベルで低下させ、その抑制メカニズムには少なくとも Jak2/STAT5 系が関与することを明らかにした。つまり、細胞外 5-HT が β -カゼインの発現抑制に寄与しているとするものである。ところが、この際、細胞外の 5-HT 濃度を測定したところ、5-HT による β -カゼイン産生抑制作用を説明するには明らかに低濃度であったことから、この抑制作用が 5-HT のみの作用によるものではないことを推察し、SSRI には 5-HT の再取り込み阻害作用だけでなく別の作用が関与するとの発想に至った。これまでに、SRT が肝臓および膵臓細胞に対して小胞体ストレスを誘導することが報告されていたことから、FLV を用いて本培養系のヒト乳腺由来 MCF-12A 中の小胞体ストレスの指標タンパク質（GRP78/BiP）の発現変化を評価した。その結果、ツニカマイシンをポジティブコントロールとした対照実験において、GRP78/BiP の発現が有意に増加したことから、FLV には小胞体ストレス作用を有することが明らかになった。今後は、この作用がすべての SSRI に共通したものであるかについて検討する必要があるとしている。

以上述べてきたように、ヒト乳腺上皮細胞株を用いた *in vitro* 実験系によって、自ら合成した 5-HT が 5-HTR₇を介して母乳産生の指標となる β -カゼインの発現を抑制することを明らかにした。さらに、この抑制には 5-HT によるものだけでなく、小胞体ストレス誘導作用が大きく寄与していることを明らかにした。今後は、この成果を臨床現場へフィードバックするために、SSRI を服用した授乳婦の母乳成分などの分析を行い、分泌型 IgA 等の母乳タンパク質や脂質などの乳児に必須な成分の解析などを行っていく必要があるとしている。

本論文は、SSRI に小胞体ストレスを誘導する作用があること、さらに他の医薬品にも小胞体ストレスにより乳腺機能を抑制する可能性があることを示唆する初めての報告と考えられる。現在までに、授乳婦に対する医薬品の投与可否の判断材料となる添付文書には、乳児への安全性に関する情報のみが記載され、授乳婦の乳腺機能に対する影響に関する情報は触れられていないことから、このような視点で医薬品の安全性を担保していくべきであるとする点は注目に値する。

したがって、本論文は、研究の意義に加えて新規性および独創性のどの観点においても本研究科課程によらない博士（薬科学）論文として十分価値のあるものと判断した。

以上