

ヒト乳腺上皮細胞を用いた選択的セロトニン再取り込み  
阻害剤による母乳タンパク質発現の抑制に関する研究

千葉 健史

## 目 次

### 総論の部

#### 緒 言

### 第 1 章 ヒト乳腺上皮細胞株 MCF-12A を用いた培養系の特性に関する検討

#### 第 1 節 母乳産生に影響を及ぼす内因性物質に対する応答性に関する評価

#### 第 2 節 セロトニン (5-HT) を介した制御機構の評価

#### 第 3 節 小括および考察

### 第 2 章 母乳タンパク質 $\beta$ -カゼインの発現抑制に関与する5-HT受容体に関する検討

#### 第 1 節 MCF-12Aにおける5-HT受容体の発現パターン解析

#### 第 2 節 $\beta$ -カゼインの発現抑制に関与する5-HT受容体の同定

#### 第 3 節 小括および考察

### 第 3 章 選択的セロトニン再取り込み阻害剤 (SSRIs) による $\beta$ -カゼイン発現の抑制メカニズムに関する評価

#### 第 1 節 MCF-12A の $\beta$ -カゼイン発現に対する SSRIs の影響

#### 第 2 節 SSRIs による $\beta$ -カゼイン発現の抑制メカニズムに関する検討 —内因性 5-HT を介した作用の検証—

#### 第 3 節 SSRIs による $\beta$ -カゼインの発現抑制メカニズムに関する検討 —小胞体ストレスを介した作用の検証—

#### 第 4 節 小括および考察

結論

謝辞

実験の部

第1章 実験の部

第2章 実験の部

第3章 実験の部

論文目録

引用文献

## 総論の部

### 緒言

母乳育児は、母子双方に対して多くの利点を有することが明らかになっている<sup>1)</sup>。母乳は、人工乳に比べて栄養学的に優れ、乳児の様々な器官の発育を促すとともに、分泌型IgA等の免疫グロブリンを含んでいることから、感染症の発症リスクを軽減することが報告されている<sup>2-4)</sup>。また、近年、母乳中の脂質が、乳児の脂肪燃焼機能の発達を促進し、成人期における肥満リスクを軽減させることも示唆されており<sup>5)</sup>、乳児に対する母乳の重要性に関する認識がさらに高まっている。さらに、母親に対しても、母乳育児は分娩後のうつ病予防効果をもたらす<sup>6)</sup>、卵巣がん<sup>7)</sup>や骨粗鬆症<sup>8)</sup>の発症リスクを低下させることが報告されている。このような利点から、母乳育児は、国際連合児童基金（UNICEF）や世界保健機関（WHO）を含む多くの公的機関や学術団体によって推奨されている<sup>9,10)</sup>。

厚生労働省が発表した平成17年度乳幼児栄養調査によると、生後3ヶ月までの乳児に対する栄養方法は、完全母乳栄養が38.0%、母乳と人工乳を併せた混合栄養が41.0%と報告されており、多くの母親が母乳で育児を行っていることが明らかにされている<sup>11)</sup>。しかしながら、欧米では授乳期の母親の90%以上が何らかの薬物治療を受け、その母親の多くが服薬による乳児への影響について不安を抱えていることも報告されており、このことが母乳育児の継続に対して障害となっていることが指摘されている<sup>12-14)</sup>。

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。特に、先進国における産後うつ病の罹患率は10～15%とされており<sup>15,16)</sup>、この時期におけるうつ病の悪化は、母子間の絆の低下、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が指摘されており、十分な治療およびケアが不可欠とされている<sup>17-20)</sup>。うつ病に汎用されて

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、その高い有効性、および他の抗うつ剤に比べて副作用が少ないという利点から、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<sup>21-25</sup>。しかしながら、最近、SSRIsの1つであるフルオキセチンにより、マウス乳腺の母乳産生機能が抑制されることが報告されており<sup>26,27</sup>、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懸念されている。

現在、臨床現場における授乳婦への医薬品の投与可否は、医療用医薬品添付文書における「妊婦、産婦、授乳婦への投与」の項に記載される情報をもとに判断されている。しかしながら、その添付文書には、「授乳による乳児への影響」に関する情報と、その情報に基づいて判断された「授乳可否」の情報のみが記載され、「乳腺の機能に対する影響」に関連する情報は一切無い。すなわち、現在の医療現場では、授乳婦に対する医薬品の投与可否を判断する際、乳児への安全原則のみを考慮しているのが現状である。母乳育児が推奨され、かつ多くの母親が母乳育児を望んでいる昨今において、授乳婦が使用する薬物の乳腺に与える影響を明らかにすることは、授乳婦に対する薬物治療において、重要な情報になると考えられる。

乳腺は、妊娠期、授乳期、および退縮期の過程で、機能的特徴が大きく変化することが知られている。特に、母乳産生を担う乳腺上皮細胞は、妊娠期に急激に増殖し、種々ホルモン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<sup>28</sup>。下垂体前葉ホルモンであるプロラクチン（prolactin, PRL）は、母乳産生を正に制御する生体内物質であり、授乳期には乳腺上皮細胞によるカゼインやラクトアルブミンなどの母乳タンパク質の合成を促進させる<sup>29</sup>。これまでに、乳腺上皮細胞による母乳タンパク質の産生機構について解析が進められており、特に乳腺の機能発達および授乳期機能の指標とされるβ-カゼインの

発現には、PRLおよびPRL受容体（PRLR）を介したjanus kinase 2/signal transducer and activator transcription 5（Jak2/STAT5）シグナル伝達系が関与していることが報告されている<sup>30-33</sup>。

SSRIsは授乳機能の指標とされる $\beta$ -カゼイン等の母乳タンパク質発現を抑制することが、ウシ乳腺上皮細胞を用いた研究で報告されているが<sup>26</sup>、その抑制メカニズムは明らかではない。SSRIsはセロトニン（5-HT）を介したメカニズムにより薬理作用を発揮するが、近年、その5-HTが母乳産生を抑制的に制御する生理活性物質であることが明らかにされた<sup>34,35</sup>。また、5-HTは乳腺上皮細胞で合成され、授乳期にはその合成が活発になるとともに、母乳中へ分泌されることから、5-HTが母乳産生制御に重要な役割を果たしているものと考えられる<sup>36</sup>。しかしながら、マウスやウシの初代乳腺上皮細胞では、5-HTによる $\beta$ -カゼイン発現の抑制が確認されているものの<sup>34,37</sup>、その抑制メカニズムの詳細は分かっていない。このことから、SSRIsの授乳期機能に対する影響を評価するためには、授乳期機能の指標とされる $\beta$ -カゼイン等の母乳タンパク質の発現に対する5-HTの制御メカニズムについて詳細な検討を行う必要があると考えられる。

細胞小器官の1つである小胞体は、細胞内で合成されたタンパク質のフォールディングや糖鎖修飾の役割を担っている。活性酸素、炎症、あるいは化学物質等による刺激が細胞に対して加わると、そのフォールディングや糖鎖修飾が正しく行われず、異常な構造をもつタンパク質が小胞体内部に蓄積する、いわゆる小胞体ストレスが起こることが明らかにされている<sup>38</sup>。小胞体ストレスは細胞の生理的機能を抑制し、その結果として様々な疾患を引き起こすことが報告されている<sup>39,40</sup>。SSRIsの1つであるセルトラリンも、ヒト肝および膵臓において、小胞体ストレスを誘導することが明らかにされている<sup>41,42</sup>。従って、授乳婦が服用したSSRIsが、乳腺組織に対して小胞体ストレスのような影響を与

え、このことが母乳産生機能の抑制に関与している可能性も考えられる。

これらのことから、乳腺上皮細胞における母乳産生制御には、いくつかのメカニズムが関与し、SSRIsによる母乳産生抑制に対してもそれらが関与していることが推測されるが、系統的な研究はほとんど行われていない。

そこで著者は、母乳タンパク質の1つで、授乳期機能の指標とされる $\beta$ -カゼインの発現に対するSSRIsの抑制メカニズムを解明するため、第1章では、入手可能で、かつPRLおよび5-HTに応答性を有する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 $\beta$ -カゼインの発現抑制に関与する5-HT受容体について検討を行った。さらに、第3章では本邦で汎用されているSSRIsの $\beta$ -カゼイン発現に対する影響を評価するとともに、そのメカニズムの解明を試みた。

以下、これら結果を3章にわたって論述する。

## 第1章 ヒト乳腺上皮細胞株MCF-12Aを用いた培養系の特性に関する検討

乳腺は、妊娠期から授乳期にかけてホルモンなどの生理活性物質の作用を受けて発達および機能分化し、授乳期特有の機能を獲得する<sup>28)</sup>。下垂体前葉ホルモンであるPRLは、乳腺の機能分化および母乳産生に不可欠なホルモンとされ、PRLRを介して、janus kinase 2/signal transduction activator transcription 5 (Jak2/STAT5)、mitogen-activated protein kinase、phosphoinositide 3-kinase等の細胞内シグナル伝達系の活性化をもたらす<sup>30, 31, 43-45)</sup>。特に、Jak2/STAT5系は、乳腺上皮細胞における授乳期機能の指標とされる $\beta$ -カゼインの産生に関与しており、この経路を介した $\beta$ -カゼインの発現には、PRLRの下流シグナルの活性化と、Jak2およびSTAT5のリン酸化が関与している (Fig. 1)。

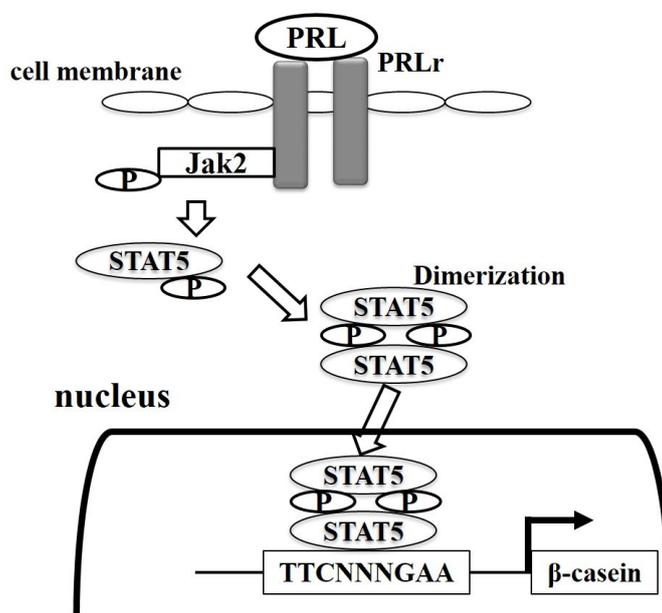
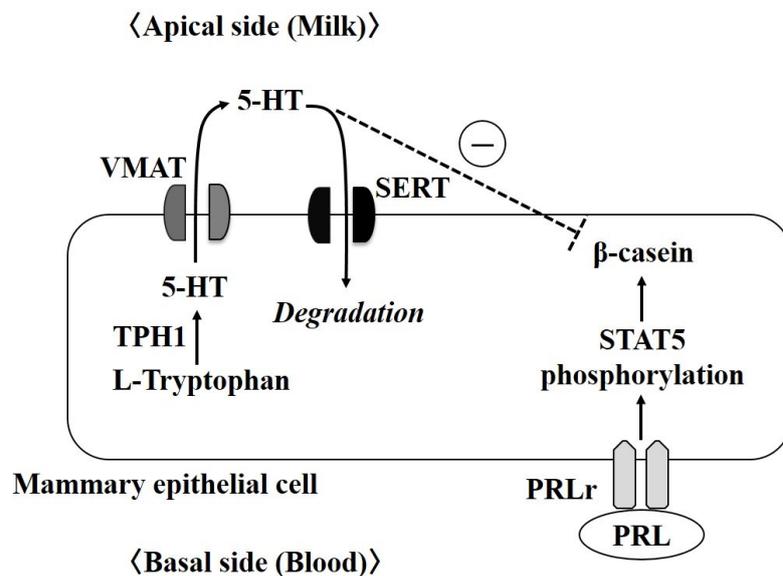


Fig. 1  $\beta$ -casein expression via Jak2/STAT5 pathway<sup>30, 31, 43-45)</sup>

一方、授乳期の乳腺上皮細胞は、5-HTを合成しており、乳腺で合成された5-HTは、シナプス小胞体トランスポーター (vesicular monoamine transporter, VMAT) を介して母乳中へ分泌され、母乳産生制御に関与している<sup>34-36</sup>。また、乳腺上皮細胞には、頂端膜側 (母乳側) に発現する5-HTトランスポーター (SERT) により母乳中5-HTを細胞内へ取り込み、細胞内で分解する機構も存在することが報告されている<sup>36</sup> (Fig. 2)。授乳期の母乳中5-HT濃度は、SERTを介した乳腺上皮細胞内への取り込みにより、通常は低濃度に維持されていると考えられているが、乳児の母乳吸てつ頻度の低下や離乳等による母乳停滞 (乳腺腺房内部が母乳で満たされた状態) が生じると、細胞内の5-HT合成が活発化し、上昇した母乳中5-HTにより母乳産生が抑制されると考えられている<sup>36</sup>。



**Fig. 2 Physiological movement of 5-HT in mammary epithelial cells**<sup>36)</sup>

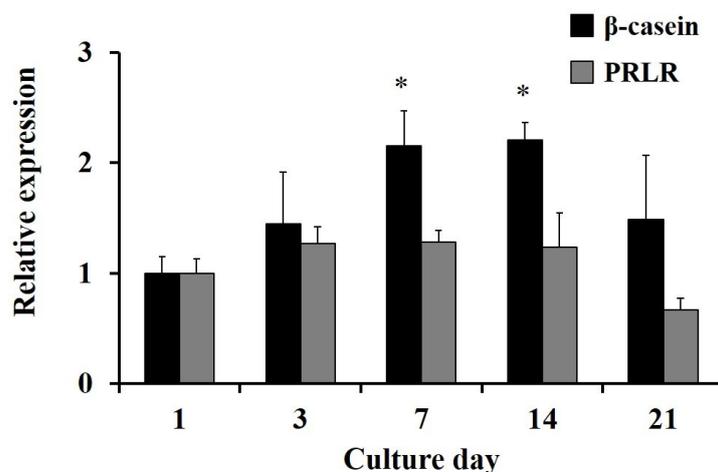
本章では、母乳タンパク質発現に対するSSRIsの影響を評価することに先立ち、MCF-12Aを用いた培養系の特性について評価を行った。MCF-12Aは、正常組織

由来のヒト乳腺上皮細胞株であり、授乳期機能の指標とされる $\beta$ -カゼインを発現することが確認されている。本章では、 $\beta$ -カゼインの発現を母乳産生機能の指標とし、母乳産生制御に関与している生理活性物質のPRLおよび5-HTに対するMCF-12Aの応答性を検討した。また、MCF-12Aにおいて5-HTを介した母乳タンパク質の制御機構が存在しているかどうかを調べるために、SERTの発現と、5-HT合成能についても評価を行った。

## 第1節 母乳産生に影響を及ぼす内因性物質に対する応答性に関する評価

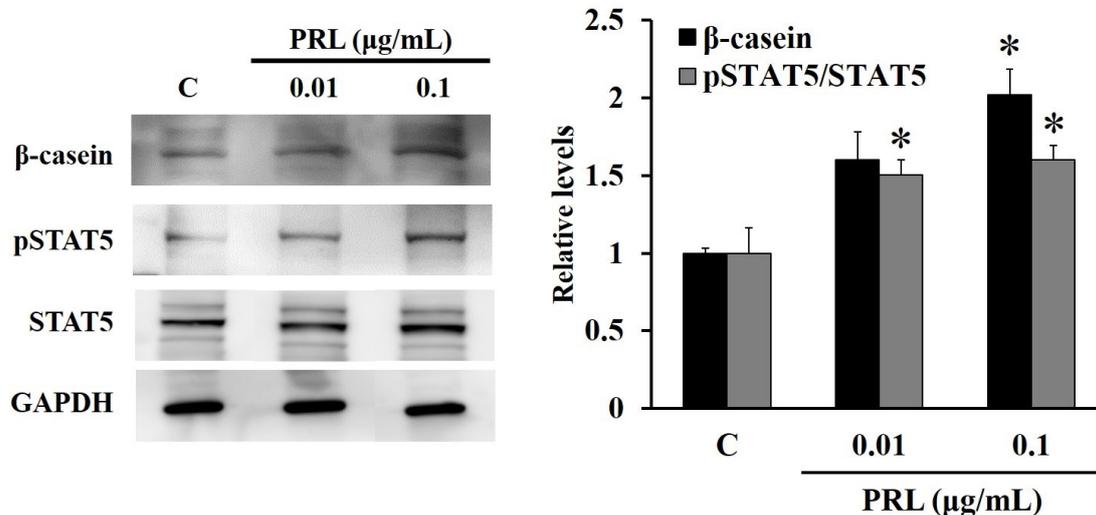
始めに、MCF-12AのPRLに対する応答性について検討を行った。Matrigel<sup>®</sup>基底膜マトリックスをコートしたディッシュに細胞を播種した後、growth medium (GM)で24時間培養し、その後、PRL (0.1  $\mu$ g/mL)を添加したdifferentiation medium (DM)に切り替えて培養を行った。播種日から3、7、14、および21日目の細胞を用いて、定量的RT-PCR法により、 $\beta$ -カゼインおよびPRLRのmRNA発現解析を行った。

Fig. 3は、 $\beta$ -カゼインおよびPRLRのmRNA発現量に対するDM処理の影響を示している。 $\beta$ -カゼインのmRNA発現量は、DMの処理期間とともに上昇し、培養7日目および14日目で最大に達し、21日目では減少した。一方、PRLRのmRNA発現量は、培養14日目まで大きな変化は認められず、21日目では $\beta$ -カゼイン同様、減少する傾向が認められた。



**Fig. 3 Effect of DM treatment on mRNA expression of  $\beta$ -casein and PRLR in MCF-12A cells.** The cells were cultured for 24 h in GM after seeding, and then the GM was replaced with DM containing 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of PRL. The relative  $\beta$ -casein and PRLR mRNA levels were analyzed by quantitative RT-PCR in the cells cultured for varying periods, compared to levels of the internal standard GAPDH. Closed and shaded bars indicate the relative expression of  $\beta$ -casein and PRLR, respectively. The values are the means  $\pm$  SEM ( $n = 3-4$ ). Asterisks (\*) indicate significantly different results (Dunnett's test,  $p < 0.05$ , compared with day 1).

続いて、MCF-12Aにおける $\beta$ -カゼインの発現に、PRLRを介したJak2/STAT5系が関与しているのかについて検討を行った。PRL処理した細胞に関しては、GMで24時間培養した後、PRL (0.01あるいは0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を含むDMでさらに6日間培養を行った。コントロール (未処理の細胞) については、細胞播種後、GMで24時間培養した後、hEGFおよびhorse serumを含まないGMで6日間培養を行った。各細胞からタンパク質を抽出し、ウェスタンブロット法により、 $\beta$ -カゼイン、リン酸化STAT5 (pSTAT5)、およびSTAT5のタンパク質発現解析を行った。 $\beta$ -カゼインのタンパク質発現量と、STAT5のリン酸化効率を示すSTAT5の発現量に対するpSTAT5の発現量の比 (pSTAT5/STAT5) に関する解析結果をFig. 4に示す。 $\beta$ -カゼインの発現量は、PRLの添加により増加し、0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度において、コントロールに比べて有意に高かった。また、pSTAT5/STAT5比は、0.01および0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ のPRL添加濃度において、コントロールに比べて有意に高かった。



**Fig. 4 Effects of PRL treatment on protein levels of  $\beta$ -casein, pSTAT5, and STAT5 in MCF-12A cells.** The relative protein levels of  $\beta$ -casein, pSTAT5, and STAT5 in PRL-treated (PRL) and vehicle control cells (C) were analyzed by western blot, compared to that of the internal standard GAPDH. Closed, shaded, and dotted bars indicate the relative levels of  $\beta$ -casein, pSTAT5, and STAT5, respectively. The values are the means  $\pm$  SEM ( $n = 3-4$ ). Asterisks (\*) indicate significantly different results (Dunnett's  $t$ -test,  $p < 0.05$ , versus control (C)).

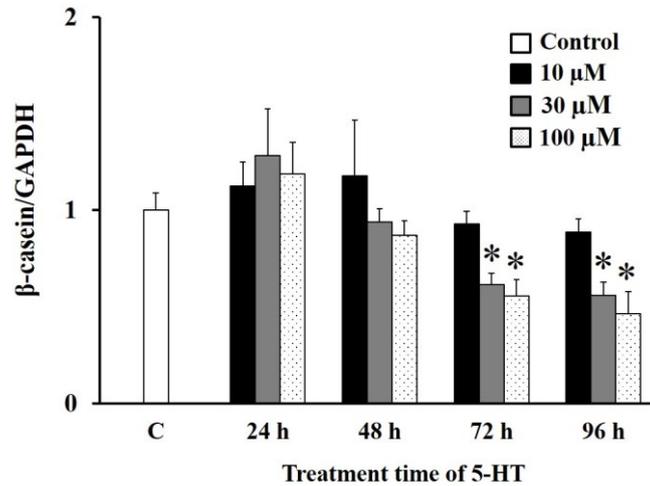
次に、本培養系の5-HTに対する応答性について評価を行った。5-HT (10、30、100  $\mu$ M) を、PRL処理した細胞に対して培養7日目に添加した。5-HTを培地中に添加後、24、48、72、あるいは96時間処理した細胞を用いて、定量的RT-PCR法による $\beta$ -カゼインmRNA発現の解析を行った。

Fig. 5Aは、 $\beta$ -カゼインのmRNA発現に対する5-HT処理の影響を示している。10  $\mu$ Mの5-HTで処理した細胞では、96時間の処理時間にわたって、 $\beta$ -カゼインのmRNA発現量に有意な変化は認められなかった。一方、30および100  $\mu$ Mで処理した細胞における $\beta$ -カゼインのmRNA発現量は、72時間目以降に有意に低下した。

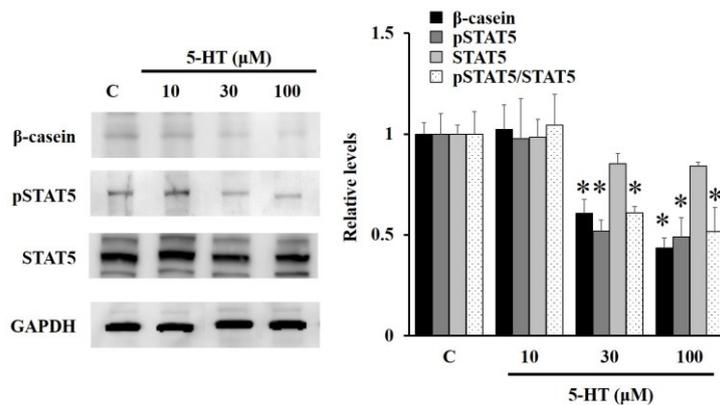
続いて、 $\beta$ -カゼインの発現に対する5-HT処理の影響について、タンパク質レ

ベルでの確認を行った。Fig. 5Bは、 $\beta$ -カゼイン、pSTAT5、STAT5のタンパク質発現量に対する解析結果を示している。mRNAの実験と同様に、5-HT（10、30、100  $\mu$ M）は、PRL処理した細胞に対して培養7日目に添加し、72時間処理した細胞について、ウェスタンブロット法を用いて $\beta$ -カゼイン、pSTAT5、およびSTAT5の発現解析を行った。その結果をFig. 5Bに示す。10  $\mu$ M 5-HTで処理した細胞における $\beta$ -カゼインおよびpSTAT5の発現量は、コントロールに比べて大きな変化を示さなかったが、30および100  $\mu$ Mの5-HTで処理した細胞では、コントロールに比べて有意に減少した。また、30および100  $\mu$ Mの5-HTで処理した細胞におけるSTAT5の発現量に対するpSTAT5の発現量の比（pSTAT5/STAT5）は、コントロールに比べて有意に低かった。これらの結果から、本培養系において、5-HTはSTAT5のリン酸化を阻害し、 $\beta$ -カゼインの発現を抑制していることが考えられた。

A)



B)



**Fig. 5 Effect of 5-HT treatment on the expression of β-casein, pSTAT5, and STAT5 in MCF-12A cells.** A) The relative mRNA levels of β-casein in 5-HT-treated and vehicle control cells (C) were analyzed by quantitative RT-PCR for the indicated culture time in serum-free DM (containing 0.1 μg/mL PRL) with 10, 30, or 100 μM 5-HT, compared to that of the internal standard GAPDH. B) The relative protein levels of β-casein, pSTAT5, and STAT5 in 5-HT-treated (5-HT) and vehicle control cells (C) were analyzed by western blot. The cells were treated with 10, 30, or 100 μM 5-HT for 72 h. Closed, shaded, and dotted bars indicate the relative levels of β-casein, pSTAT5, and STAT5, respectively. The values are the means ± SEM (n = 3–4). Asterisks (\*) indicate significantly different results (Dunnett's *t*-test, *p* < 0.05, versus control (C)).

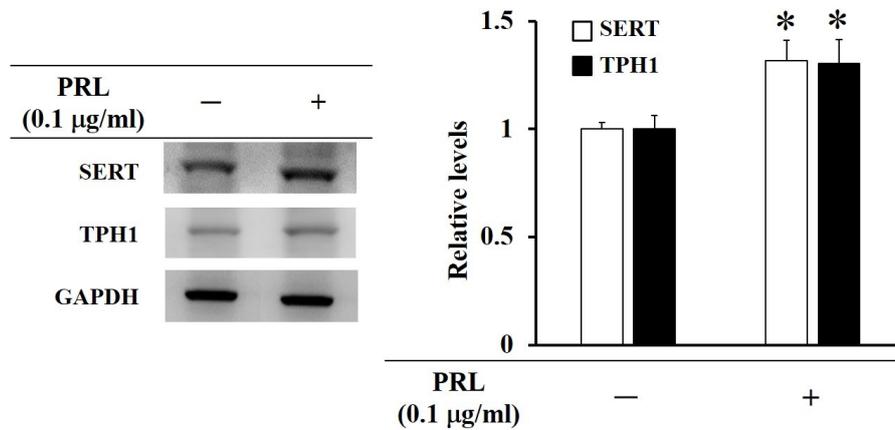
## 第2節 5-HTを介した制御機構の評価

授乳期の乳腺上皮細胞には、細胞内で合成した内因性5-HTを母乳中へ分泌し、その母乳中5-HTを母乳側（頂端膜側）の細胞膜に発現するSERTを介して細胞内へ取り込む機構が存在する（Fig. 1）。本節では、MCF-12Aにおける5-HT合成および5-HTの取り込み機構の存在を調べるために、5-HTの合成律速酵素であるトリプトファン水酸化酵素1（tryptophan hydroxylase 1、TPH1）<sup>36)</sup>およびSERTの発現を評価するとともに、細胞外（培地中）5-HT量の測定を行った。

PRLで処理した細胞は、GMで24時間培養した後、DM（PRL 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ を含む）で6日間培養した細胞とした。また、未処理の細胞は、細胞播種後、GMで24時間培養した後、hEGFおよびhorse serumを含まないGMで6日間培養した細胞とした。両細胞からタンパク質を抽出し、ウェスタンブロット法により、TPH1およびSERTの発現解析を行った。また、両細胞における細胞外5-HT量の比較では、培地中の5-HT量をHPLCで測定した。

Fig. 6は、TPH1およびSERTのタンパク質発現量に対するPRL処理の影響を示している。Table 1には、PRL処理した細胞と未処理の細胞における細胞外5-HT量の測定結果を示す。なお、未使用培地中には5-HTは検出されず、本研究で用いた培地中に5-HTが添加されていないことを確認した（data not shown）。

PRL処理した細胞におけるTPH1およびSERTの発現量は、未処理の細胞に比べて有意に高かった（Fig. 6）。また、PRL処理あるいは未処理の細胞の培地中に検出された（細胞外5-HT量）は、単位細胞数（ $10^6$  cells）あたりに換算すると、それぞれ $0.28 \pm 0.07$  ngあるいは $0.41 \pm 0.05$  ngであり、PRL処理した細胞で有意に高かった（Table 1）。



**Fig. 6 Effects of PRL treatment on protein expression of SERT and TPH1 in MCF-12A cells.** The relative protein levels of SERT and TPH1 in PRL-treated (PRL (+)) and untreated cells (PRL (-)) were analyzed by western blot and normalized to that of the internal standard GAPDH. The open bars in the diagram indicate the relative level of SERT, whereas the closed bars represent the relative level of TPH1. The values are the mean  $\pm$  SEM (n = 3–4). Asterisks (\*) indicates significantly different results (Student's *t*-test, \**p* < 0.05).

**Table 1 Extracellular 5-HT amount in MCF-12A cells with and without PRL treatment**

	5-HT amount	<i>p</i> value
<b>without PRL</b>	<b>0.28 <math>\pm</math> 0.07 ng/10<sup>6</sup> cells</b> <b>(0.96 <math>\pm</math> 0.3 nM)</b>	
<b>with PRL</b>	<b>0.41 <math>\pm</math> 0.05 ng/10<sup>6</sup> cells</b> <b>(1.4 <math>\pm</math> 0.2 nM)</b>	<b><i>p</i> &lt; 0.05</b> <b>(vs. without PRL)</b>

Extracellular 5-HT in PRL-treated cells and vehicle-treated cells was measured by HPLC. The values are mean  $\pm$  S.E.M. (n = 3–4 experiments); Data were compared by one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer test for the indicated comparisons.

### 第3節 小括および考察

本章では、母乳タンパク質の1つで授乳期機能の指標とされる $\beta$ -カゼインの発現に対する SSRIs の影響を評価することに先立ち、その影響を評価するための、ヒト乳腺上皮細胞株 MCF-12A を確立した。

まず、PRL に対する応答性について、MCF-12A における PRLR 発現および  $\beta$ -カゼインの mRNA 発現に対する DM (0.1  $\mu$ g/mL PRL 含有) の影響について評価した。その結果、MCF-12A における PRLR の mRNA レベルでの発現が確認され、DM の処理時間の延長とともに  $\beta$ -カゼインの mRNA 発現量は増加することが明らかとなった (Fig. 3)。また、PRL 処理により  $\beta$ -カゼインの発現がタンパク質レベルで誘導されること (Fig. 4)、および  $\beta$ -カゼインの発現に関与する PRLR を介した Jak2/STAT5 系の活性化も確認され (Fig. 4)、本培養系が PRL に対して応答性を有しているものと考えられた。

乳腺組織では、上皮細胞の頂端膜側が母乳側、基底膜側が血液側に相当し、ヒト乳腺上皮細胞における PRLR は基底膜側だけでなく、頂端膜側にも発現していることが報告されている<sup>46)</sup>。MCF-12A は極性を有する細胞株であり<sup>47)</sup>、本培養系においては、Matrigel<sup>®</sup>基底膜マトリックス (ディッシュ底面) に接している面が基底膜側、培地に浸っている側が頂端膜側となる。本研究では、MCF-12A における PRLR の発現部位について確認をしていないが、本研究では培地に添加した PRL により  $\beta$ -カゼインがタンパク質レベルで誘導され、かつ、STAT5 のリン酸化の誘導も確認されているので、頂端膜側に発現する PRLR が関与している可能性が考えられた。

5-HT に対する応答性の評価では、MCF-12A における  $\beta$ -カゼインの mRNA およびタンパク質発現が、5-HT 処理により減少することが確認された。ウシおよびマウスの初代乳腺上皮細胞を用いた研究において、0.2 mM 5-HT の 48 時間処

理が、 $\beta$ -カゼインおよび $\alpha$ -ラクトアルブミンの mRNA 発現を抑制したことが報告されている<sup>34, 37)</sup>。これらの結果は、本研究の結果と一致しており、本培養系が 5-HT に対して応答性を有することを示している。また、5-HT 処理による  $\beta$ -カゼインのタンパク質発現の減少とともに、pSTAT5 の減少も確認された (Fig. 5B) ことは、5-HT が STAT5 のリン酸化を阻害し、 $\beta$ -カゼインの発現を抑制していることを示唆している。

5-HT を介した制御機構に関する評価では、MCF-12A において、乳腺上皮細胞内で 5-HT 合成に関与する律速酵素の TPH1 や、SERT の発現が確認され、両者が PRL 処理で有意に増加するという結果が得られた。授乳期のマウス乳腺上皮細胞における 5-HT 合成は、非授乳期に比べて活発化し、SERT の発現量も有意に高くなることが報告されていることから<sup>27, 35)</sup>、本培養系でも、マウスの授乳期乳腺と類似した現象が起こっていると考えられる。本研究で用いた培地の中に 5-HT は検出されなかったが、MCF-12A の培養に伴って培地中に 5-HT が検出されたことから、MCF-12A は 5-HT 合成能を有し、合成した 5-HT を細胞外へ分泌していることが明らかとなった。

一方、SERT を過剰発現させたヒト胎児腎臓由来 HEK 細胞を用いた研究において、SERT の Km 値は  $1.28 \pm 0.19 \mu\text{M}$ <sup>48)</sup>と報告されている。本研究における PRL 処理した細胞の細胞外 5-HT 濃度 (1.4 nM) は、その Km 値よりもかなり低い値であった。このことは、もし、MCF-12A に発現する SERT に細胞外 5-HT を取り込む機能が存在すると仮定するならば、その速度は極めて小さい可能性を示している。

細胞外 5-HT 量は、5-HT の分泌機構と取り込みのバランスによって決まると考えられる。乳腺上皮細胞で合成された 5-HT が細胞外へ分泌される機構には、細胞内外のプロトンイオンの電気化学的勾配を駆動力とした VAMT が関与して

いることが分かっている<sup>36)</sup>。本研究では、MCF-12A が合成した 5-HT の分泌および取り込み機構に関する検討は行っていないが、PRL 処理した細胞における細胞外 5-HT 量が、未処理の細胞に比べて高いという結果をもたらした要因について考察すると、MCF-12A における 5-HT の細胞外への分泌速度は、細胞内へ取り込む速度よりも速いことに起因している可能性が考えられる。細胞外 5-HT 量がどのように制御されているのかを確かめるためには、今後、これらの機構について詳細に検討を行う必要がある。

以上の結果から、本培養系における MCF-12A には、5-HT を介した制御機構が存在している可能性が考えられ、本培養系は母乳産生機能に対する SSRI の影響を評価できる培養系であると考えられた。

## 第2章 母乳タンパク質 $\beta$ -カゼインの発現抑制に関与する 5-HT 受容体に関する検討

5-HT は、神経伝達物質の 1 つであり、特異的受容体に結合することにより、その作用を果たすことが知られている。乳腺組織では、5-HT は母乳産生を抑制的に制御する内因性物質であることが明らかにされており<sup>34, 35)</sup>、その作用発現に対しても受容体を介した機構が関与していることが考えられる。

5-HT 受容体 (5-HTRs) は様々な組織に発現し、1~7 のファミリーと、A~D のサブタイプが知られ、合計 13 種類のサブタイプが存在することが確認されている<sup>49)</sup>。特に、初代ウシ乳腺上皮細胞では、5-HTR<sub>1B</sub>、5-HTR<sub>2A</sub>、5-HTR<sub>2B</sub>、5-HTR<sub>4</sub>、および 5-HTR<sub>7</sub> の 5 つの受容体の発現が確認されており、このうち、5-HTR<sub>2A</sub>、5-HTR<sub>2B</sub>、および 5-HTR<sub>7</sub> が、 $\beta$ -カゼインの発現抑制に関与していることが報告されている<sup>37)</sup>。一方、ヒト乳腺上皮細胞には、5-HTR<sub>1D</sub>、5-HTR<sub>2B</sub>、5-HTR<sub>3A</sub>、および 5-HTR<sub>7</sub> の 4 つの受容体が発現していることが報告されているが<sup>50)</sup>、 $\beta$ -カゼインの発現抑制に関与する 5-HTRs は明らかにされていない。

前章において、著者は、MCF-12A における 5-HT 処理が、STAT5 のリン酸化を阻害し、 $\beta$ -カゼイン発現を抑制することを示し、MCF-12A が 5-HT に対する応答性を有する細胞であることを確認した。しかしながら、MCF-12A に発現している 5-HT 受容体は不明であり、5-HT による $\beta$ -カゼイン発現の抑制に関与する 5-HT 受容体も明らかではない。

そこで、本章では、MCF-12A に発現する 5-HT 受容体の発現パターンについて解析するとともに、 $\beta$ -カゼインの発現抑制に関与する 5-HT 受容体の検討を行った。

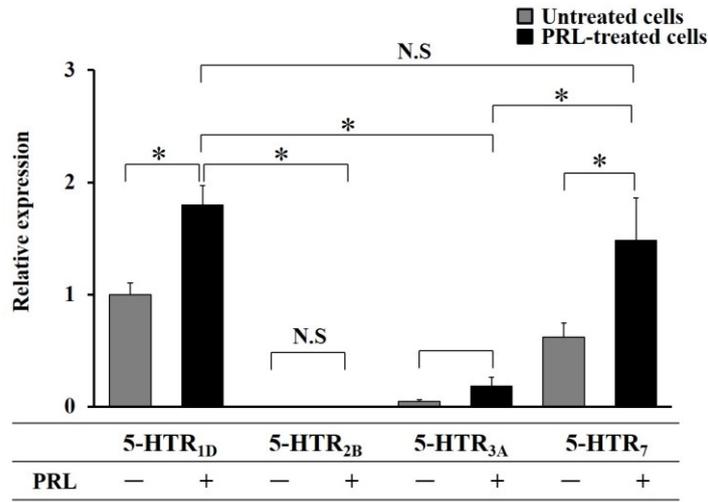
## 第1節 MCF-12A における 5-HT 受容体の発現パターン解析

本節では、まず始めに、ヒト乳腺上皮細胞で発現が確認されている 5-HTR<sub>1D</sub>、5-HTR<sub>2B</sub>、5-HTR<sub>3A</sub>、および 5-HTR<sub>7</sub> の 4 つの受容体が、MCF-12A に発現しているのかどうかを評価した。

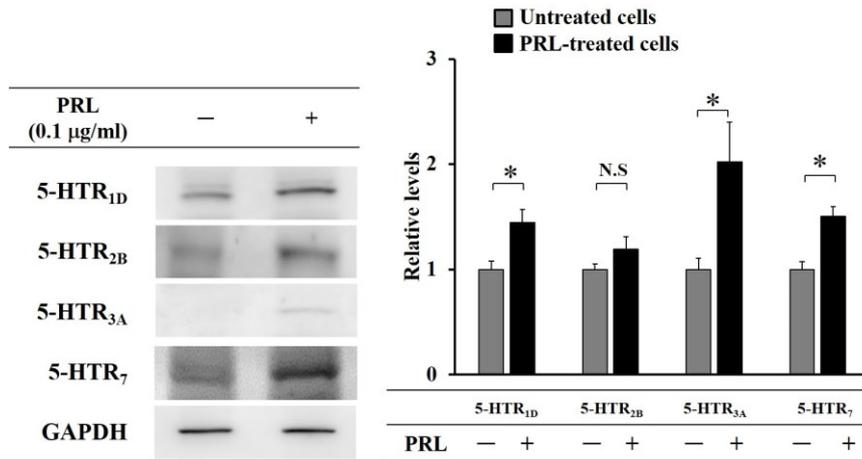
Fig. 7 は、MCF-12A における 4 つの受容体の mRNA およびタンパク質レベルでの発現解析結果を示す。MCF-12A には、4 つの受容体すべてについて、mRNA レベルでの発現が認められ、その発現量は、PRL 処理により有意に増加した (Fig. 7A)。また、PRL 処理した細胞の発現量のみに着目すると、5-HTR<sub>1D</sub> および 5-HTR<sub>7</sub> の発現量は他の 2 つの受容体に比べて有意に高かった。

次に、各受容体のタンパク質レベルでの発現を確認したところ、4 つの受容体は、タンパク質レベルでもすべて発現しており、その発現量は、mRNA の結果と同様に PRL 処理により有意に増加した (Fig. 7B)。

A)



B)

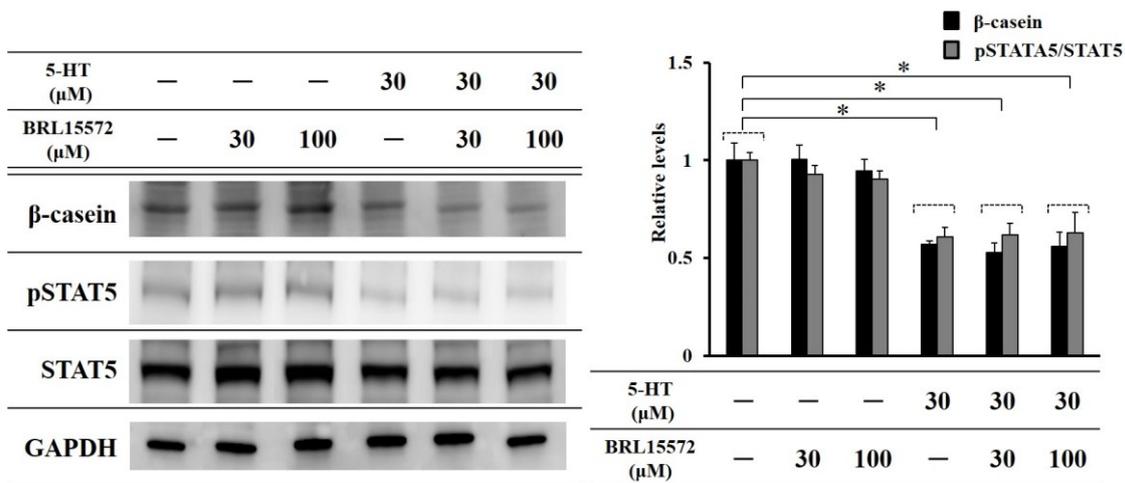


**Fig. 7 Expression of 5-HT Receptors and Tryptophan Hydroxylase 1 in MCF-12A Cells.** A) The relative mRNA levels of the 5-HTRs (5-HTR<sub>1D</sub>, 5-HTR<sub>2B</sub>, 5-HTR<sub>3A</sub>, and 5-HTR<sub>7</sub>) in PRL-treated (closed bars) and untreated (shaded bars) cells were analyzed by quantitative RT-PCR relative to an internal standard (GAPDH). The values are the means  $\pm$  SEM (n = 3–4). \* $p$  < 0.05, Tukey-Kramer test. B) The relative protein levels of the 5-HTRs (5-HTR<sub>1D</sub>, 5-HTR<sub>2B</sub>, 5-HTR<sub>3A</sub>, and 5-HTR<sub>7</sub>) in PRL-treated (closed bars) and untreated (shaded bars) cells were analyzed by western blot, respectively. The values are the means  $\pm$  SEM (n = 3–4). \* $p$  < 0.05, Student's *t*-test.

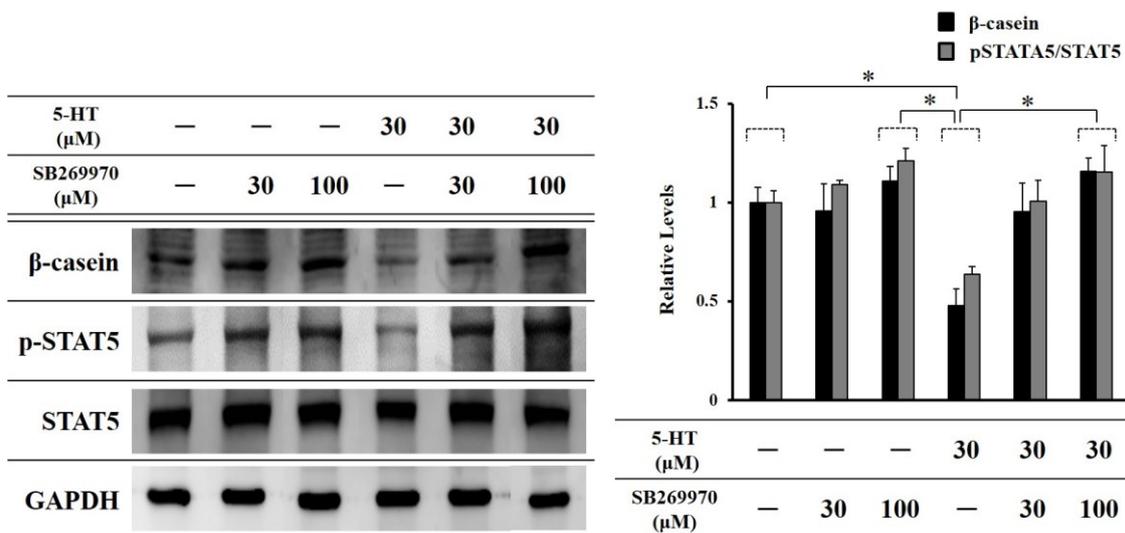
## 第2節 $\beta$ -カゼインの発現に関与する 5-HT 受容体の同定

本節では、前節の結果をもとに、MCF-12A に高い発現量が確認された 5-HTR<sub>1D</sub> および 5-HTR<sub>7</sub>に着目し、これら 2 つの受容体が  $\beta$ -カゼインの発現抑制に関与しているのかについて、それぞれの受容体に対する選択的阻害剤を用いて検討した。5-HTR<sub>1D</sub> に対しては BRL15572 (30 および 100  $\mu$ M)、5-HTR<sub>7</sub> に対しては SB269970 (30 および 100  $\mu$ M) をそれぞれ選択的阻害剤として用い、 $\beta$ -カゼインおよび STAT5 のリン酸化効率を示す pSTAT5/STAT5 比を評価した。

Fig. 8 および 9 は、それぞれ BRL15572 および SB269970 で処理したときの MCF-12A における  $\beta$ -カゼインのタンパク質発現量および pSTAT5/STAT5 比を示している。5-HTR<sub>1D</sub> に関して、BRL15572 で単独処理した時、 $\beta$ -カゼインおよび pSTAT5/STAT5 比は、未処理の細胞と同等であった (Fig. 8)。一方、5-HTR<sub>7</sub> に関して、100  $\mu$ M の SB269970 単独で処理した時、 $\beta$ -カゼインおよび pSTAT5/STAT5 比は、未処理の細胞に比べて増加傾向を示した (Fig. 9)。また、30  $\mu$ M 5-HT の単独処理による  $\beta$ -カゼインおよび pSTAT5/STAT5 比の減少は、併用した SB269970 の添加濃度に依存して阻害された (Fig. 9)。さらに、100  $\mu$ M SB269970 および 30  $\mu$ M 5-HT で併用処理した細胞における  $\beta$ -カゼインおよび pSTAT5/STAT5 比は、100  $\mu$ M SB269970 で単独処理した細胞と同等であった (Fig. 9)。以上の結果から、MCF-12A における 5-HT による  $\beta$ -カゼイン発現の抑制には、5-HTR<sub>7</sub> が関与していることが示唆された。



**Fig. 8 Effects of selective 5-HT<sub>1D</sub> receptor antagonists on  $\beta$ -casein expression in MCF-12A cells.** The relative protein levels of  $\beta$ -casein, pSTAT5, and STAT5 in cells treated with the indicated concentrations of 5-HT and/or the selective 5-HTR<sub>1D</sub> antagonist (BRL15572) for 72 h were analyzed by western blot. Closed bars and shaded bars indicate the relative levels of  $\beta$ -casein and pSTAT5/STAT5, respectively. The values are the mean  $\pm$  SEM (n = 3–4). \**p* < 0.05, Tukey-Kramer test.



**Fig. 9 Effects of selective 5-HT<sub>7</sub> receptor antagonists on  $\beta$ -casein expression in MCF-12A cells.** The relative protein levels of  $\beta$ -casein, pSTAT5, and STAT5 in cell extracts treated with the indicated concentrations of 5-HT and/or the selective 5-HTR<sub>7</sub> antagonist (SB269970) for 72 h were analyzed by western blot. Closed bars and shaded bars indicate the relative levels of  $\beta$ -casein and pSTAT5/STAT5, respectively. The values are the mean  $\pm$  SEM (n = 3–4). \**p* < 0.05, Tukey-Kramer test.

### 第3節 小括と考察

本章では、MCF-12A における 5-HTRs の発現を評価するとともに、5-HT による  $\beta$ -カゼインの発現抑制に関与する 5-HTRs について検討を行った。その結果、MCF-12A には、既にヒト乳腺上皮細胞で発現が確認されている 5-HTR<sub>1D</sub>、5-HTR<sub>2B</sub>、5-HTR<sub>3A</sub>、および 5-HTR<sub>7</sub> の 4 つの受容体が発現しており、これら受容体の発現量は、すべて PRL 処理で誘導された。前章では、PRL 処理による MCF-12A 細胞内での 5-HT 合成と細胞外への分泌増大が認められており、本章で得られた受容体発現量の増加との関連性が示唆された。

ウシの初代乳腺上皮細胞を用いた研究において、5-HTR<sub>1B</sub>、5-HTR<sub>2A</sub>、および 5-HTR<sub>7</sub> の対する特異的アゴニストが、 $\beta$ -カゼインの mRNA 発現を増加させたことが報告されている<sup>37)</sup>。しかしながら、初代ヒト乳腺上皮細胞やヒト乳腺上皮細胞株 MCF-10A には、5-HTR<sub>1B</sub> および 5-HTR<sub>2A</sub> は発現していないことも報告されている<sup>50)</sup>。このことは、ヒト乳腺では、5-HTR<sub>1B</sub> および 5-HTR<sub>2A</sub> が  $\beta$ -カゼインの発現抑制に関与している可能性が低いことを示唆している。本研究では、MCF-12A における 5-HTR<sub>1D</sub> および 5-HTR<sub>7</sub> の発現量が他の受容体よりも高かったことから、これら 2 つの受容体が 5-HT による  $\beta$ -カゼインの発現抑制に関与しているかどうかをそれぞれ評価した。5-HTR<sub>1D</sub> の選択的阻害剤である BRL15572 と 5-HT で併用処理した細胞における  $\beta$ -カゼインおよび pSTAT5/STAT5 レベルは、5-HT で単独処理した細胞と同等であった。しかしながら、5-HTR<sub>7</sub> の選択的阻害剤である SB269970 と 5-HT で併用処理した細胞における  $\beta$ -カゼインおよび pSTAT5/STAT5 レベルは、5-HT で単独処理した細胞に比べて、SB269970 の併用濃度に依存して増加し、30  $\mu$ M 5-HT と 100  $\mu$ M SB269970 の併用では、コントロールと比べて高い傾向を示した。これらの結果は、5-HT は、5-HTR<sub>7</sub> を介して

STAT5 のリン酸化を阻害し、 $\beta$ -カゼインの発現を抑制していることを示している。

本研究では、MCF-12A における 5-HTR<sub>7</sub> の発現局在は確認していないが、ヒト乳腺上皮細胞株 MCF-10A における 5-HTR<sub>7</sub> は、basal および lateral の両側に発現していることが報告されている<sup>35)</sup>。一方、MCF-12A におけるタイトジャンクションの形成は弱いことが報告され<sup>51)</sup>、従って、本培養系では apical 側に添加された 5-HT がタイトジャンクションバリアを通り抜けて lateral 側に発現した 5-HTR<sub>7</sub> に結合し、 $\beta$ -カゼインの発現を抑制していることも考えられる。すなわち、この結果は、生体内における母乳産生制御に対して、母乳中 5-HT だけでなく、血中に存在する 5-HT も関与している可能性を示唆するものであり、この点に関しては今後さらに検討が必要と考えられる。

5-HTR<sub>7</sub> は、7 回膜貫通型の Gs タンパク共役型受容体であり、5-HTR<sub>7</sub> を介したシグナルは、アデニル酸シクラーゼの活性化と cAMP の増加をもたらし、続いて protein kinase A (PKA)、extracellular signal regulated kinase (ERK) および protein kinase B (Akt) の転写因子を誘導することが報告されている<sup>51)</sup>。これまで、マウスの線維芽細胞を用いた研究により、PKA が STAT5 を介したシグナリングの抑制因子であることが報告されている<sup>52)</sup>。また、ヒトメラノーマ細胞を用いた研究では、ERK が Jak2/STAT5 系に対して抑制的に作用することも報告されている<sup>54)</sup>。これらのことから、MCF-12A における 5-HT による  $\beta$ -カゼインの発現抑制に対しても、PKA あるいは ERK を介した STAT5 のリン酸化の阻害が関与していることが推測され、これらシグナル伝達因子に関する検証も必要と考えられる。

以上の検討から、MCF-12A における 5-HT による受容体機構を介した  $\beta$ -カゼインの発現抑制には主に 5-HTR<sub>7</sub> が関与しており、この抑制には 5-HTR<sub>7</sub> の下流の転写因子を介した STAT5 のリン酸化の阻害が関与していることが推測される。

### 第3章 選択的セロトニン再取り込み阻害剤 (SSRIs) による $\beta$ -カゼイン発現の抑制メカニズムに関する評価

第1章において、母乳産生機能に影響を及ぼすことが知られている内因性物質の PRL と 5-HT に対して、MCF-12A が応答性を有する細胞株であること、同細胞株には 5-HT を介した  $\beta$ -カゼイン発現制御機構が存在することを明らかにした。また、第2章では、5-HT が 5-HTR<sub>7</sub> を介して STAT5 のリン酸化を阻害し、 $\beta$ -カゼイン発現を抑制することを明らかにした。このような母乳産生機能の抑制は、SSRIs の1つであるフルオキセチンによっても起こることがマウス乳腺において報告されている<sup>27)</sup>。さらに、初代ウシ乳腺上皮細胞を用いた研究でも、フルオキセチンは授乳期機能の指標とされる  $\beta$ -カゼインの mRNA 発現を抑制することが報告されているが<sup>26)</sup>、そのメカニズムは明らかではない。SSRIs は母乳中へ移行するとともに、5-HT を介して薬理作用を発揮する薬物であることから、SSRIs による  $\beta$ -カゼイン発現の抑制には、内因性 5-HT を介した作用が関与している可能性が考えられる。一方、同じく SSRIs の1つであるセルトラリンは、肝や膵臓細胞を用いた研究において、小胞体ストレスを誘導し、その生理機能を抑制することが報告されている<sup>41,42)</sup>。この知見は、SSRIs が内因性 5-HT を介したシグナル伝達経路とは別に、小胞体ストレスのような直接的な作用によって乳腺に影響を及ぼしている可能性があり、このことが  $\beta$ -カゼインの発現抑制に関与していることを示唆している。

本章では、日本で汎用されている3つの SSRIs (フルボキサミンマレイン酸塩 (FLV)、パロキセチン塩酸塩 (PRX)、およびセルトラリン塩酸塩 (SRT)) を用いて、MCF-12A における  $\beta$ -カゼインの発現に対する影響を評価するとともに、内因性 5-HT によるシグナル伝達系を介した作用および小胞体ストレス誘導作用

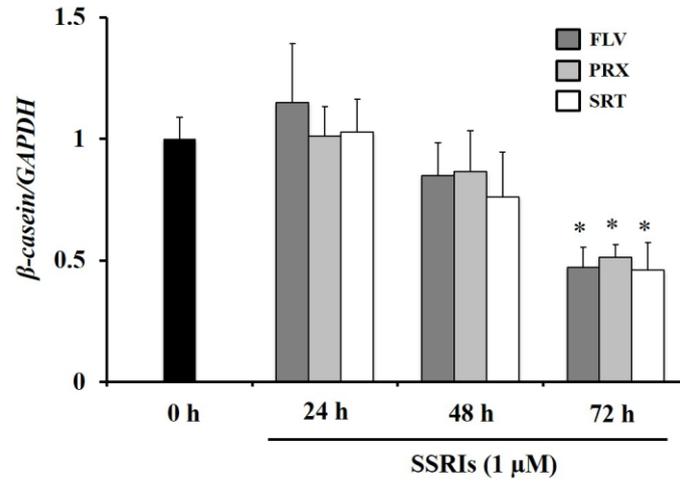
に着目し、それぞれの寄与について検討した。

## 第1節 MCF-12A の $\beta$ -カゼイン発現に対する SSRIs の影響

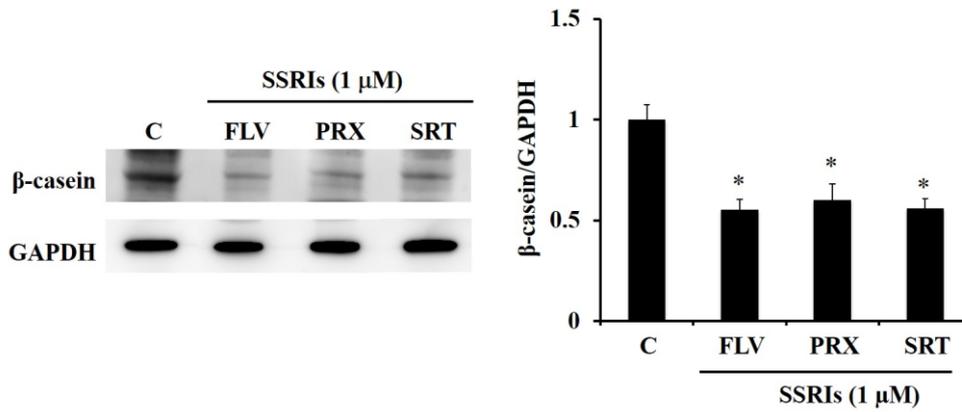
本節では、FLV、PRX、および SRT を用いて、MCF-12A における  $\beta$ -カゼイン発現に対する影響について評価した。各 SSRIs の添加濃度は、いずれも  $1 \mu\text{M}$  とし、SSRIs の処理は培養 7 日目に開始した。

Fig. 10 は、 $\beta$ -カゼインの mRNA およびタンパク質発現に対する SSRIs 処理の影響を示している。各 SSRIs で処理した細胞における  $\beta$ -カゼインの mRNA の発現量は、処理後 48 時間までは有意な変化を示さなかったが、72 時間の時点ではすべての SSRIs が  $\beta$ -カゼインの mRNA 発現量を有意に減少させた (Fig. 10A)。各 SSRIs ( $1 \mu\text{M}$ ) で 72 時間処理した細胞について、 $\beta$ -カゼインのタンパク質発現に対する影響を評価したところ、3 つの SSRI は  $\beta$ -カゼインの発現をタンパク質レベルで減少させることが明らかとなった (Fig. 10B)。

A)



B)



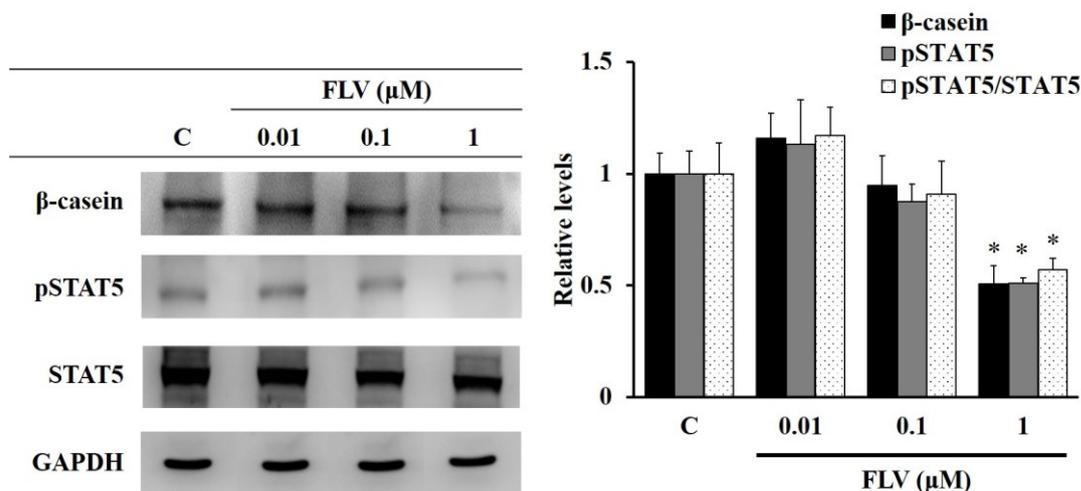
**Fig. 10 Effect of SSRIs treatment on  $\beta$ -casein expression in MCF-12A cells.**

A) The relative mRNA levels of  $\beta$ -casein in SSRIs-treated and untreated cells (0 h) were analyzed by quantitative RT-PCR for the indicated culture time in serum-free DM (containing 0.1  $\mu$ g/mL PRL) with 1  $\mu$ M SSRIs, compared to that of the internal standard GAPDH. B) The relative protein levels of  $\beta$ -casein in SSRIs-treated and vehicle control cells (C) were analyzed by western blot. The cells were treated with 1  $\mu$ M SSRIs for 72 h. The values are the means  $\pm$  SEM (n = 3–4). Asterisks (\*) indicate significantly different results (Dunnett's *t*-test, *p* < 0.05, versus control (C)).

## 第2節 SSRIによる $\beta$ -カゼインの発現抑制メカニズムに関する 検討—内因性 5-HT を介した作用の検証—

前節において、いずれの SSRI も MCF-12A の  $\beta$ -カゼインの発現を抑制することが確認されたことから、本節では代表的な SSRI として FLV を選択し、 $\beta$ -カゼインの発現抑制メカニズムについて検討を行った。

Fig. 11 は、 $\beta$ -カゼイン、pSTAT5、および STAT5 のタンパク質発現に対する FLV 処理濃度の影響を示している。0.01 および 0.1  $\mu$ M の条件下では、 $\beta$ -カゼイン、pSTAT5、および pSTAT5/STAT5 レベルに、有意な変化は認められなかったが、1  $\mu$ M の条件下ではいずれの発現も有意に減少した。この結果から、本培養系において、FLV は STAT5 のリン酸化を阻害することにより、 $\beta$ -カゼインの発現を抑制することが明らかとなった。この現象は、前章で示したように、5-HT 処理が  $\beta$ -カゼイン発現を抑制する現象とほぼ一致していることから、MCF-12A における FLV による  $\beta$ -カゼイン発現の抑制には、MCF-12A における内因性 5-HT を介した作用が寄与している可能性が考えられた。



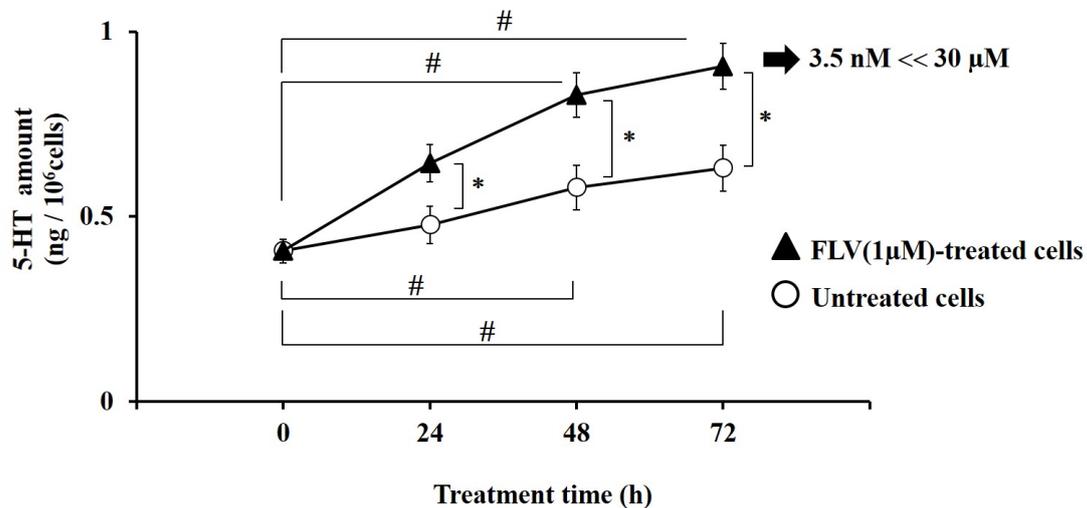
**Fig. 11 Effect of FLV treatment on expression of  $\beta$ -casein, pSTAT5, and STAT5 in MCF-12A cells.** Relative protein levels of  $\beta$ -casein, pSTAT5, STAT5 were analyzed by western blot in FLV-treated and vehicle control cells (C), and the ratio of pSTAT5 to STAT5 (pSTAT5/STAT5) was determined. The cells were treated with the indicated concentrations of FLV for 72 h. The values are the mean  $\pm$  SEM (n = 3–4). Asterisks (\*) indicate significantly different results (Dunnett's *t*-test, \**p* < 0.05, vs. vehicle control).

そこで、FLVによる $\beta$ -カゼインの発現抑制に内因性 5-HT を介した作用が関与しているかどうかの検証を行った。具体的には、 $\beta$ -カゼインの発現抑制が観察された 1  $\mu$ M FLV で処理した細胞における細胞外 5-HT 量の経時的変化を評価した。

Fig. 12 は、FLV で処理した細胞と未処理の細胞における細胞外 5-HT 量の経時的変化を示している。FLV で処理した細胞における細胞外 5-HT 量は未処理の細胞に比べて増加し、処理後 24 時間目以降で有意に推移した。この結果から、FLV は本培養系において、その本来の薬理作用の発現に関する機構、すなわち細胞外へ分泌された内因性 5-HT の細胞内取り込みを抑制し、細胞外の 5-HT 量を増加させることが示唆された。

しかしながら、1  $\mu$ M FLV で処理した細胞における 72 時間目の細胞外 5-HT 量を濃度換算すると約 3.5 nM であり、第 1 章で示した  $\beta$ -カゼインの発現を抑制す

る 5-HT 濃度の 30  $\mu\text{M}$  に比べて、約 1000 倍以上低い濃度であることも明らかとなった。

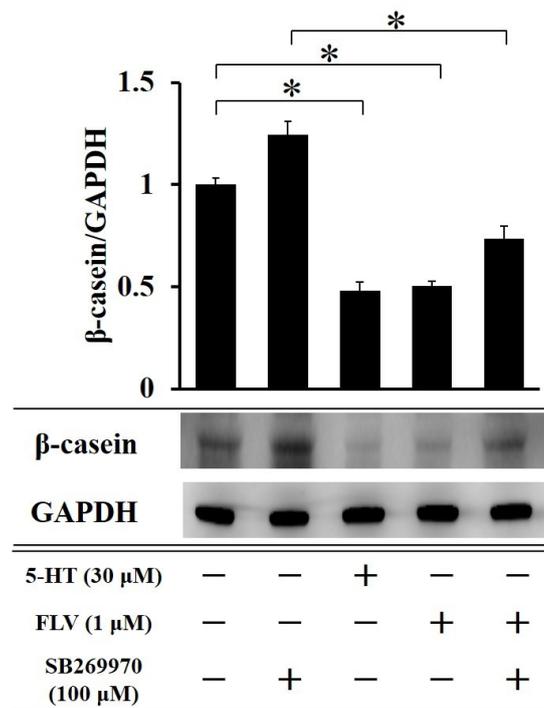


**Fig. 12 Influence of FLV on extracellular 5-HT released from MCF-12A cells.** Extracellular 5-HT in fluvoxamine-treated cells and vehicle-treated cells was measured by HPLC at the indicated time-points. The values are mean  $\pm$  S.E.M. (n = 3–4 experiments); \*  $p < 0.05$ , #  $p < 0.01$ , two-way ANOVA followed by Tukey-Kramer test for the indicated comparisons.

そこで、本培養系において、FLV 処理によって増加した細胞外 5-HT が、5-HTR<sub>7</sub> を介して  $\beta$ -カゼインの発現を抑制しているのかどうかを確認した。具体的には、SB269970 (5-HTR<sub>7</sub> 選択的阻害剤)、5-HT、あるいは FLV で 72 時間併用処理した細胞における  $\beta$ -カゼインの発現量について評価した。

Fig. 13 は、 $\beta$ -カゼインのタンパク質発現に対する FLV および SB269970 処理の影響を示している。100  $\mu\text{M}$  の SB269970 で単独処理した細胞における  $\beta$ -カゼインの発現量は、コントロールに比べて若干高い傾向が認められ、FLV あるいは 5-HT で単独処理した細胞では、コントロールに比べて有意に低下した。一方、FLV と SB269970 で併用処理した細胞における  $\beta$ -カゼインの発現量は、FLV で単独処理した細胞に比べて高い傾向を示したものの、SB269970 で単独処理した細胞に比べると有意に低かった。

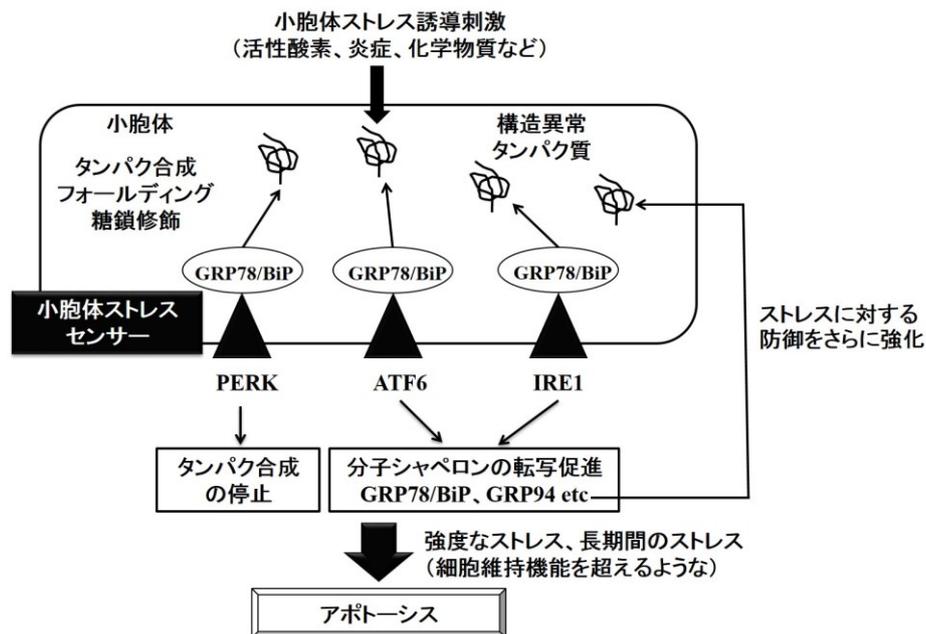
本培養系における FLV による  $\beta$ -カゼインの発現抑制が、内因性 5-HT による 5-HTR<sub>7</sub> を介した作用に起因しているならば、FLV と SB269970 で併用処理した細胞における  $\beta$ -カゼインの発現量は、SB269970 で単独処理した細胞と同等のレベルを示すと考えられる。しかしながら、今回の結果では、FLV と SB269970 で併用処理した細胞の  $\beta$ -カゼインの発現量は、SB269970 で単独処理した細胞と比べて有意に低く、FLV 単独処理と比べて若干高い傾向を示したことから、FLV による  $\beta$ -カゼインの発現抑制には、内因性 5-HT を介した作用が部分的に寄与しているものの、別の作用の関与が大きいと考えられた。



**Fig. 13 Effect of co-treatment with FLV and a selective 5-HTR<sub>7</sub> inhibitor on  $\beta$ -casein expression in MCF-12A cells.** The relative protein levels of  $\beta$ -casein in the cells treated with 5-HT, FLV, and/or selective 5-HTR<sub>7</sub> inhibitor SB269970 for 72 h were analyzed by western blot. The values are the mean  $\pm$  SEM (n = 3–4). Asterisks (\*) indicate significantly different results (Tukey-Kramer test, \* $p$  < 0.05, vs. vehicle control cells).

### 第3節 SSRIによる $\beta$ -カゼインの発現抑制メカニズムに関する 検討—小胞体ストレスを介した作用の検証—

細胞小器官の1つである小胞体は、膜タンパク質や分泌タンパク質を合成し、合成されたタンパク質のフォールディングや糖鎖修飾の役割を担っている。しかしながら、活性酸素や炎症、あるいは化学物質等による刺激が細胞に加わると、そのフォールディングや糖鎖修飾が正しく行われず、異常な構造をもつタンパク質が小胞体内部に蓄積する、いわゆる小胞体ストレスが起こることが知られている。一方、小胞体膜上には、3種類の小胞体ストレスセンサー (pancreatic endoplasmic reticulum kinase (PERK)、inositol-requiring enzyme 1 (IRE1)、activating transcription factor 6 (ATF6)) と呼ばれる分子が存在している。通常の状態では、各センサーの小胞体内腔部分に、分子シャペロンである glucose-related protein 78/binding protein (GRP78/BiP) が結合し、各センサーの活性が抑制されている。小胞体ストレスが発生し、異常なタンパク質が小胞体内部に蓄積すると、各センサーから GRP78/BiP が乖離し、異常なタンパク質を修復することにより、細胞機能を正常化しようと働くが、正常化機能を超えるような過度なストレスが細胞にかかると、細胞の生理機能を抑制したり、アポトーシスを引き起こす (Fig. 14)<sup>38)</sup>。

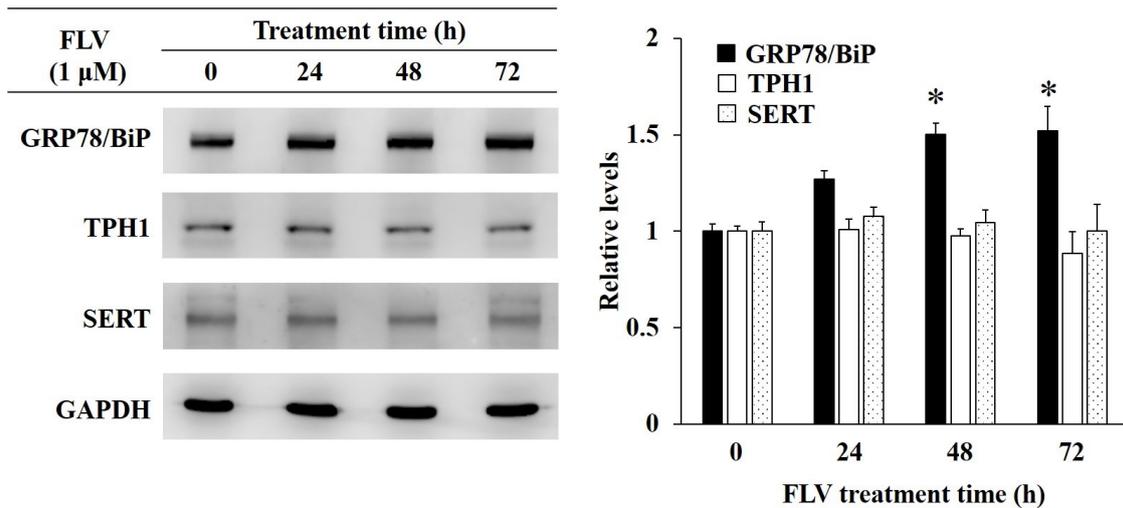


**Fig. 14 Molecular mechanisms for endreticulum stress responses**  
(文献 38 より一部改変)

SSRIs の 1 つである SRT は、肝あるいは膵臓細胞において、小胞体ストレスを誘導することが報告されている<sup>41, 42)</sup>。前節において、FLV による $\beta$ -カゼインの発現抑制には、内因性 5-HT を介した作用とは別の作用の関与が大きいことが確認されたことから、本節では FLV による $\beta$ -カゼインの発現抑制に対して小胞体ストレス誘導作用が関与しているのかどうかを検証した。本検討では、小胞体ストレスマーカーである GRP78/BiP の発現量、細胞内 5-HT 合成に関与する TPH1、および SERT の発現量に対する FLV 処理の影響を評価した。FLV の添加濃度は、 $\beta$ -カゼインの発現抑制が観察された 1  $\mu$ M とした。

Fig. 15 は、GRP78/BiP、TPH1、SERT のタンパク質発現に対する FLV 処理の影響を示している。1  $\mu$ M の FLV で 24、48、あるいは 72 時間単独処理した細胞では、TPH1 および SERT の発現量に変化は認められなかった。一方、分子シャペロンの 1 つであり、小胞体ストレスの指標される GRP78/BiP の発現量は、FLV

の処理時間とともに徐々に増加し、48 および 72 時間の時点で、未処理の細胞に比べて有意に増加した (Fig. 15)。この結果から、本培養系において、FLV の処理は MCF-12A に対する小胞体ストレスを誘導することが明らかとなった。

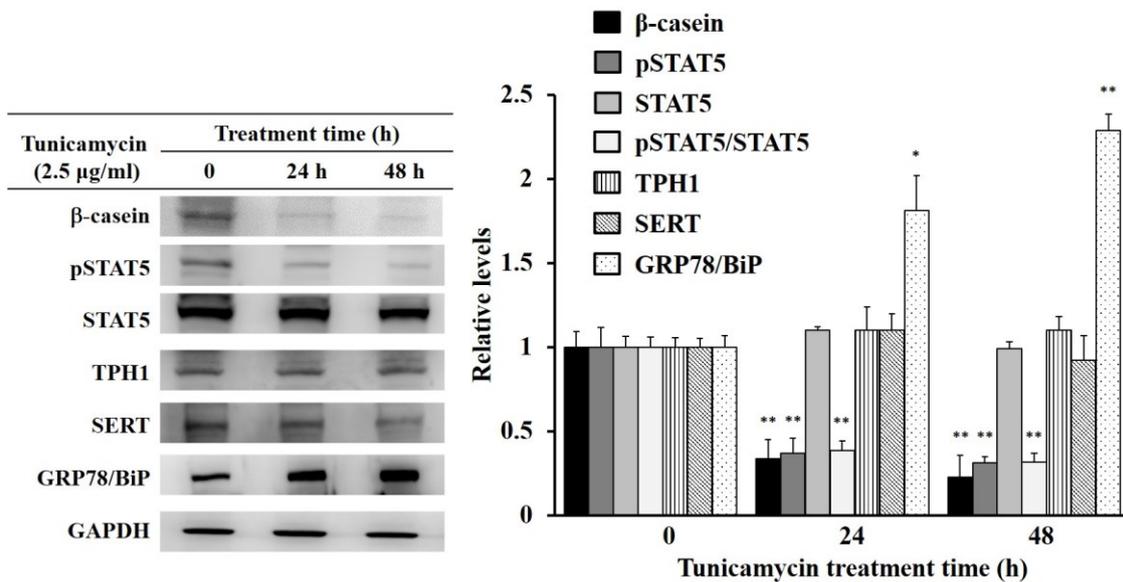


**Fig. 15 Influence of FLV on GRP78/BiP, TPH1, and SERT expression in MCF-12A cells.** The relative protein levels of TPH1, SERT, and GRP78/BiP in the cells treated with 1 μM of FLV for the indicated time period were analyzed by western blot. The values are the mean ± SEM (n = 3–4). Asterisks (\*) indicate significantly different results (Dunnett's *t*-test, \**p* < 0.05, vs. untreated cells at 0 h).

さらに、FLV による小胞体ストレスの誘導が β-カゼインの発現に対してどのような影響を及ぼすのかを評価するため、小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシンを用い、β-カゼイン、pSTAT5、STAT5、SERT、TPH1、および GRP78/BiP の発現変動について検討した。ツニカマイシンの添加濃度は 2.5 μg/mL とし、FLV 同様、培養 7 日目に添加した。

Fig. 16 は、β-カゼイン、pSTAT5、STAT5、SERT、TPH1、および GRP78/BiP のタンパク質発現に対するツニカマイシン処理の影響を示している。ツニカマイシンで 48 時間処理した細胞における TPH1 および SERT の発現量は、未処理

の細胞に比べて有意に変化しなかった。一方、 $\beta$ -カゼインおよび pSTAT5 の発現量は、24 時間の処理により有意に減少し、GRP78/BiP の発現量はツニカマイシンの処理時間とともに大きく増加した (Fig. 16)。この結果は、先に示した FLV 単独処理による  $\beta$ -カゼイン発現に対する抑制現象と類似していたことから、FLV による  $\beta$ -カゼインの発現抑制には、小胞体ストレス誘導が関与していることが考えられた。



**Fig. 16 Effect of tunicamycin on expression of  $\beta$ -casein, pSTAT5, STAT5, TPH1, SERT, and GRP78/BiP in MCF-12A cells.** The relative protein levels of  $\beta$ -casein, pSTAT5, STAT5, TPH1, SERT, and GRP78/BiP were analyzed by western blot in tunicamycin-treated and untreated cells (0 h), and the ratio of pSTAT5 to STAT5 (pSTAT5/STAT5) was also determined. The cells were treated with 2.5  $\mu$ g/mL tunicamycin for 48 h. The values are the mean  $\pm$  SEM (n = 3–4). Asterisks (\*) indicate significantly different results (Dunnett's *t*-test, \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01 vs. untreated cells at 0 h).

## 第4節 小括および考察

本章では、日本で汎用されている3つのSSRIs (FLV、PRX、SRT) を用いて、MCF-12Aにおける $\beta$ -カゼイン発現に対する影響を評価するとともに、FLVによる $\beta$ -カゼイン発現の抑制メカニズムについて検討を行った。

3つSSRIs (1  $\mu$ M) は、いずれもMCF-12Aの $\beta$ -カゼイン発現を、mRNAおよびタンパク質レベルで抑制することが明らかとなった (Fig. 10A および 10B)。FLVについて、 $\beta$ -カゼイン発現への影響を詳細に検討したところ、1  $\mu$ M FLVで72時間処理した細胞における $\beta$ -カゼイン、pSTAT5、およびpSTAT5/STAT5レベルは未処理のコントロールに比べて有意に減少することが確認された (Fig. 11)。Hernandezらは、初代ウシ乳腺上皮細胞を用いて、SSRIsの1つであるフルオキセチン (40  $\mu$ M) での48時間処理が、 $\beta$ -カゼインのmRNA発現を有意に低下させることを報告しており<sup>26)</sup>、本研究で得られた結果はこの報告と一致している。加えて、本研究では、FLVがSTAT5のリン酸化を阻害することにより $\beta$ -カゼインの発現を抑制することが明らかとなった。一方、FLVによる $\beta$ -カゼインの発現抑制に関する現象は、第1章および第2章で示した5-HT処理による現象と一致していたことが確認されたことから、FLVは、部分的に内因性5-HT制御機構を介してMCF-12Aにおける $\beta$ -カゼイン発現の抑制を引き起こしていると考えられた。

次に、FLVによる $\beta$ -カゼインの抑制に対して、内因性5-HTの寄与を評価するため、2つの実験を行った。まず、FLV処理後の細胞外5-HTの経時的变化を評価したところ、1  $\mu$ M FLVで処理した細胞外5-HT量は、処理時間とともに処理前 (0 h) に比べて有意に増加し、コントロール細胞と比べても有意に増加することが確認された (Fig. 12)。これらの結果から、本培養系において、FLVは、

細胞外へ分泌された内因性 5-HT の細胞内取り込みを阻害していることが示唆された。しかしながら、FLV で 72 時間処理した細胞における細胞外 5-HT 濃度は約 3.5 nM であり、この濃度は、第 1 章で示した  $\beta$ -カゼインの発現を抑制する 5-HT 処理濃度 (30  $\mu$ M) よりも非常に低いことも明らかとなった。続いて、FLV によって増加した細胞外 5-HT が、 $\beta$ -カゼインの発現抑制に関与しているのかどうかを評価した。その結果、1  $\mu$ M FLV と 100  $\mu$ M SB269970 で併用処理した細胞における  $\beta$ -カゼインの発現量は、100  $\mu$ M SB269970 で単独処理した細胞に比べて有意に低かった (Fig. 13)。この結果は、FLV による  $\beta$ -カゼインの発現抑制において、内因性 5-HT を介した作用の寄与は低いことを示すものと考えられ、別の作用メカニズムの寄与を考慮する必要があると推測された。

マウスから単離した膵島を用いた研究において、SSRIs の 1 つであるセルトラリン処理 (30  $\mu$ M) は小胞体ストレスを誘導し、膵島からのインスリン分泌を減少させることが報告されている<sup>42)</sup>。著者は、FLV による  $\beta$ -カゼイン発現抑制に関与する可能性があるメカニズムのうちの一つとして、SSRI の小胞体ストレス誘導作用に着目し検討を行った。 $\beta$ -カゼインの発現抑制を認められた 1  $\mu$ M の FLV 処理は、TPH1 および SERT の発現に有意に影響しなかったが、小胞体ストレスマーカーである GRP78/BiP の発現量は、FLV の処理時間とともに上昇し、48 および 72 時間の処理で有意に増加した (Fig. 14)。これらの結果は、FLV が MCF-12A に対して徐々に小胞体ストレスを引き起こすことを示している。さらに、小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシンでの 48 時間処理は、SERT および TPH1 の発現には影響せず、 $\beta$ -カゼインおよび pSTAT5 の発現を有意に減少させた (Fig. 15)。この結果は、FLV 処理により得られた結果と類似しており、FLV がツニカマイシンと共通したメカニズム、すなわち小胞体ストレス誘導を引き起こしていることを示唆している。ヒト前立腺がん細胞株 DU145 における

24 時間にわたる 1  $\mu\text{M}$  ツニカマイシン処理は、Jak2/STAT3 における STAT3 のリン酸化を抑制し、この抑制には、上流の転写因子である Jak2 のリン酸化の阻害が関与していることが報告されている<sup>55)</sup>。これらの知見を合わせると、FLV による  $\beta$ -カゼインの抑制には、小胞体ストレスを介した Jak2 のリン酸化の抑制が関与している可能性があり、この抑制が STAT5 のリン酸化の抑制を引き起こしていることが示唆された。

日本人を対象にした臨床研究において、FLV を 200 mg/日の投与量で服用したうつ病患者の 12 時間後の血中濃度は、0.11~1.23  $\mu\text{M}$  と報告されている<sup>56)</sup>。FLV は、塩基性物質であり、かつ高い脂溶性を有しており<sup>57)</sup>、FLV の平均 M/P 比（母親の母乳中 FLV 濃度に対する血漿中 FLV 濃度）は 1.32<sup>58)</sup>と報告されている。このことは、母乳中の FLV 濃度が血漿中濃度を超える可能性があることを示しており、本研究の結果は、臨床的重要性を示していることが考えられる。

以上より、MCF-12A における FLV による  $\beta$ -カゼインの発現抑制には、内因性 5-HT を介した制御機構が部分的に寄与しているものの、小胞体ストレス誘導作用による寄与が大きいことが示唆された。

SRT による小胞体ストレス誘導には、小胞体ストレスセンサーである PERK および IRE1 の活性化が関与していることが報告されている<sup>41, 42)</sup>。PRX による小胞体ストレス誘導に関する報告はまだ無いが、PRX は、FLV および SRT と同様の抗うつ作用を有することから、PRX も小胞体ストレスを引き起こす可能性は高いと考えられる。本研究では、SRT および PRX については詳細な検討を行っていないが、SSRIs の種類によってこれらの作用の影響の程度や寄与率は異なるものと推測され、今後この点について検討が必要と考えられる。

## 結 論

以上、3章にわたり、著者はSSRIsによる母乳タンパク質 $\beta$ -カゼイン発現の抑制に関する研究を行い、以下のような結論を得た。

### 1) ヒト乳腺上皮細胞株 MCF-12A を用いた培養系の特性について

まず、生体内で母乳産生に影響を及ぼすことが知られている PRL および 5-HT に対する本培養系の応答性について評価した。母乳産生を増加させる PRL に対する応答性に関する検討では、MCF-12A における PRLR の発現が mRNA レベルで確認され、授乳期機能の指標とされる  $\beta$ -カゼインおよびその発現に関与する pSTAT5 の発現が、PRL 処理により誘導されるという結果を得た。これらの結果から、本培養系における MCF-12A には、生体内と同様に  $\beta$ -カゼインの発現に関与する PRLR を介した Jak2/STAT5 系が存在していること、および PRL に対して応答性を有していることが示された。また、母乳産生を抑制的に制御する内因性物質の 5-HT を本培養系に添加した結果、 $\beta$ -カゼインの mRNA およびタンパク質発現の減少が確認されことから、本培養系が 5-HT に対して応答性を有することも示された。また、5-HT 処理が、 $\beta$ -カゼインの発現とともに、その発現に関与する pSTAT5 の発現も併せて抑制するという結果が得られたことから、5-HT は STAT5 のリン酸化を阻害することにより、 $\beta$ -カゼインの発現を抑制するという新たな知見を得ることができた。

5-HT を介した制御機構の存在に関する評価では、MCF-12A における TPH1 および SERT の発現がタンパク質レベルで確認され、細胞外（培地中）に 5-HT が存在することも確認された。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 が細胞外へ分泌されて

いることも明らかとなり、5-HT を介した制御機構が存在している可能性が示唆された。

以上の検討から、MCF-12A を用いた培養系は、母乳タンパク質発現に対する SSRIs の影響を評価する上で有用な培養系と考えられた。

## 2) $\beta$ -カゼインの発現抑制に関与する 5-HT 受容体について

$\beta$ -カゼインの発現抑制に関与する 5-HT 受容体を調べるにあたり、MCF-12A における 5-HT 受容体の発現について評価した。その結果、MCF-12A には、ヒト乳腺上皮細胞で確認されている 4 つの受容体 (5-HTR<sub>1D</sub>、5-HTR<sub>2B</sub>、5-HTR<sub>3A</sub>、5-HTR<sub>7</sub>) が発現していることが確認され、この内、5-HTR<sub>7</sub> が  $\beta$ -カゼインの発現抑制に関与していることが示唆された。

## 3) SSRIs による $\beta$ -カゼインの発現抑制メカニズムについて

日本で汎用されている 3 つの SSRIs (FLV、PRX、SRT) を用いて、MCF-12A における  $\beta$ -カゼイン発現に対する影響を評価するとともに、FLV による  $\beta$ -カゼイン発現の抑制メカニズムについて検討を行った。その結果、3 つの SSRIs (1  $\mu$ M) は、いずれも MCF-12A の  $\beta$ -カゼイン発現を抑制することが明らかとなった。また、FLV を用いて、 $\beta$ -カゼイン発現の抑制メカニズムについて検討を行ったところ、FLV は小胞体ストレス誘導剤のツニカマイシンや 5-HT と同様に、STAT5 のリン酸化を阻害し、 $\beta$ -カゼイン発現を抑制していることが明らかとなった。さらに、FLV による  $\beta$ -カゼイン発現の抑制には、5-HT を介した作用が部分的に関与し、小胞体ストレス誘導作用が大きく寄与していることが示唆された。

以上、著者は、5-HT および FLV による  $\beta$ -カゼイン発現の抑制に関与するメカニズムについて、新たな知見を得た。緒言でも述べたように、授乳婦に対する

医薬品の投与可否の判断材料である添付文書には、乳児への安全性に関する情報のみが記載されており、乳腺機能に対する影響に関する情報は一切ない。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。しかしながら、本研究の成果は、あくまで培養細胞を用いた結果によるものであり、こ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。

## 謝 辞

終わりに臨み、本研究を行うにあたり、終始懇切なご指導並びにご鞭撻を賜りました岩手医科大学薬学部 工藤賢三教授に深甚なる謝意を表します。

また、本研究を行うにあたり、終始ご指導ならびにご鞭撻を賜りました岩手医科大学薬学部 三部篤教授、日本薬科大学薬学部 前田智司准教授に深謝の意を表します。

また、本論文の作成にあたり、ご指導並びに御校閲と御教示を賜りました城西大学大学院薬学研究科 上田秀雄教授、同大学薬学部 木村聡一郎助教に深く感謝致します。

さらに、本研究に際し、御協力を賜りました城西大学学長 森本雍憲先生、岩手医科大学 高橋勝雄名誉教授に厚く御礼申し上げます。

## 実験の部

### 第1章 実験の部

#### 1. 試薬

セロトニン (5-HT) およびプロラクチン (PRL) は、和光純薬工業より購入した。その他の試薬は、市販の特級品を用いた。

#### 2. 細胞培養

##### 2-1) 細胞

MCF-12A 細胞は、American Type Culture Collection (ATCC, CRL-10782™, VA, USA) より入手した。

##### 2-2) 培地調製

DMEM/F12 (1:1) (Life technologies 社) に、20 ng/mL hEGF (Corning 社)、10 µg/ml human insulin (Sigma-Aldrich 社)、0.5 µg/ml hydrocortisone (Sigma-Aldrich 社)、100 IU/ml penicillin (Sigma-Aldrich 社)、100 µg/ml streptomycin (Sigma-Aldrich 社)、5% horse serum (Life technologies 社) を添加し、増殖用培地 (growth medium ; GM) とした。また、horse serum および hEGF を含まない GM に PRL (0.01 あるいは 0.1 µg/mL) を添加したものを分化用培地 (differentiation medium ; DM) とした。

##### 2-3) Matrigel®基底膜マトリックスコートしたディッシュの作製

-20°C で保存された Matrigel®基底膜マトリックス (Corning 社) を 4°C で解凍し、その後、Phosphate buffer saline (PBS) を用いて 45 倍希釈し、コーティン

グ溶液とした。ディッシュに、コーティング溶液を培養面積 (cm<sup>2</sup>) 当たり 0.3 mL 添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーター (37°C、5%CO<sub>2</sub>) 内で 1 時間インキュベートした後、クリーンベンチ内で 10 分間室温放置した。その後、余分な溶液を吸引除去し、PBS で 1 回洗浄した後、乾燥させた。

#### 2-4) 培養方法

MCF-12A は、すべての条件において、Matrigel<sup>®</sup>基底膜マトリックスコートしたディッシュに 1×10<sup>5</sup> cell/cm<sup>2</sup> の密度で播種された。細胞数は、改良ノイバウエル血球計算盤 (ミナトメディカル (株)) を用いて算出した。

PRL 未処理の細胞に関しては、播種後、GM で 24 時間培養した後、hEGF および horse serum を含まない GM で 6 日間培養した。PRL 処理細胞に関しては、播種後、GM を用いて 24 時間培養し、その後、GM から DM へ培地を切り替え、6 日間培養した。また、5-HT の処理を行う場合には、PRL 処理細胞を用い、培養 7 日目の時点で DM に 5-HT が添加された培地に切り替え、24、48、72、あるいは 96 時間処理した。

### 3. 定量的 RT-PCR

Total RNA の抽出には RNeasy Mini Kit<sup>®</sup> (QUIAGEN, Venlo, Netherland) を用いた。また、逆転写反応には High Capacity RNA to cDNA<sup>™</sup> Kit (Life technologies 社) を用い、マニファクチャープロトコールに従って、Total RNA 2 μg 分を cDNA へ変換させた。

各遺伝子における定量的 RT-PCR には、TaqMan Gene Expression assay (Life technologies 社) および TaqMan Universal Master Mix II (Life technologies 社) を

用い、Table 1 に示した容量で混合液を調製し、7500 リアルタイム PCR システム (Life technologies 社) を用いて増幅反応を行った。なお、反応条件は、Table 2 に示す温度サイクルで実施した。 $\beta$ -casein および PRL receptor の mRNA 発現量は、GAPDH の発現量に対する相対発現量として示した。

Table 1 Reaction mixture for amplifying cDNA by quantitative RT-PCR

Component	Volume ( $\mu$ l)
➤ TaqMan UniversaL Master Mix II	15
➤ TaqMan Gene Expression Assay	1.5
<i><math>\beta</math>-casein</i> (Hs_00914395_m1)	
<i>Prolactin receptor</i> (Hs_00168739_m1)	
TE buffer	10.5
➤ cDNA solution	3
Total	30 $\mu$ l

Table 2 Temperature cycling for amplification of cDNA by quantitative RT-PCR

Temperature ( $^{\circ}$ C)	Time	Cycle
50	2 min	1
95	10 min	1
95	10 sec	60
60	1 min	

#### 4. ウェスタンブロッティング

タンパク質の抽出には、M-PER<sup>®</sup> mammalian protein extraction reagent (タカラバイオ社) を用いた。抽出液中のタンパク濃度は、BCA Protein Assay kit (Pierce社) を用いて定量した。抽出液中のタンパク濃度を定量した後、抽出液と 5 倍濃縮サンプルバッファー溶液 (10% sodium dodecyl sulfate (SDS)、0.25 M Tris-HCl (pH6.8)、25%グリセリン、25%メルカプトエタノール、および 0.1%ブロモフェノールブルーの混合液) を 4:1 の割合で混合し、サンプル溶液とした。

一定量のサンプル溶液を 7.5%あるいは12.5% のポリアクリルアミドゲルにアプライし、電気泳動 (ゲル 1 枚あたり 20 mV、65 min) を行った後、ゲルから polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に電氣的に転写した (ゲル 1 枚あたり 400 mA、1 hr)。転写後、PVDF 膜をブロックエース水溶液 (雪印メグミルク社) 中に浸し、4°C の条件下で 1 晩放置した後、検出目的に応じた 1 次抗体および 2 次抗体 (Table 3) と反応させた。検出試薬には、Amersham ECL<sup>TM</sup> Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare 社) を用い、Image Reader LAS-3000 System (富士フィルム社) により観察した。なお、検出されたバンドの定量化には、Image J. Ver. 1.48 (National Institutes of Health, USA) を使用した。

Table 3 A list of primary and secondary antibodies

Antibody	Product name (company)	Host	Dilution rate
Primary	Anti- $\beta$ -casein, Mouse-mono (Novus Biologicals)	Mouse	1/400
	Anti-STAT5 (phospho Y694) antibody (Abcam)	Rabbit	1/400
	Anti-STAT5 antibody (Abcam)	Rabbit	1/1000
	Anti-Tryptophan Hydroxylase antibody (TPH1)	Rabbit	1/250
	Anti-Serotonin transporter antibody (Abcam)	Rabbit	1/250
	Anti-GAPDH Mouse mAb (6C5) (Calbiochem)	Mouse	1/2000
Secondary	Goat anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz)	Mouse	1:2000
	Goat anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz)	Rabbit	1:2000

## 5. 培地中（細胞外）5-HT 量の測定

培地中（細胞外）5-HT の定量に先立ち、固相抽出カラムの Supel™-Select SCX SPE (60 mg/3 ml, SUPELCO 社) を用いて前処理を行った。1%ギ酸を含むメタノール溶液および水で、前処理カラムのコンディショニング化を行った後、培地 6 mL をカラムへアプライした。蒸留水でカラムを洗浄した後、メタノールおよび 5%NH<sub>2</sub>OH を含むメタノール溶液を用い、カラムに保持された 5-HT を溶出した。溶出液の溶媒を遠心エバポレーターで除去した後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析に使用する移動相で溶質を再溶解し、試料とした。また、培地を採取後、改良ノイバウエル血球計算盤 (ミナトメディカル (株)) を用いて細胞数を算出した。

試料中の 5-HT 量は、HPLC (Prominence, 島津製作所) で測定した。分析条件を以下に示す。なお、内部標準物質にはプロカイン塩酸塩を用いた。

Table 4 HPLC の分析条件

分析カラム	Kinetex <sup>®</sup> C18 カラム、5 $\mu$ m、150 $\times$ 4.6 mm (島津製作所)
移動相組成	1 mM オクタンスルホン酸ナトリウム含有 0.15 mM 酢酸バッファー：メタノール (75: 25)
測定波長	励起波長 280 nm、蛍光波長 340 nm
カラム温度	37 $^{\circ}$ C
流速	1.5 mL/min

## 6. 統計解析

多群間の比較では、一元配置の分散分析を行った後、Dunnett's t-test を用いて解析を行った。また、2 群間の比較には Student's t-test を用いて解析を行った。なお、すべての統計解析において、 $p < 0.05$  の場合を有意として判定した。

## 第2章 実験の部

### 1. 試薬

セロトニン (5-HT) およびプロラクチン (PRL) は、和光純薬工業より購入した。5-HT<sub>1D</sub> 受容体の選択的阻害剤 BRL15572、5-HT<sub>7</sub> 受容体の選択的阻害剤 SB269970 は、Abcam 社から購入した。その他の試薬は市販の特級品を用いた。

### 2. 細胞培養

#### 2-1) 細胞

MCF-12A 細胞は、第1章で示した方法で入手した。

#### 2-2) 培地調製

本章で使用した培地の調製は、第1章で示した方法に従った。

#### 2-3) Matrigel<sup>®</sup>基底膜マトリックスコートしたディッシュ作製

第1章で示した方法に従った。

#### 2-4) 培養方法

PRL 処理および未処理の細胞に関しては、第1章で示した方法に従った。本章で用いた試薬 (5-HT、5-HT<sub>1D</sub> 選択的受容体阻害剤 BRL15572、あるいは 5-HT<sub>7</sub> 選択的阻害剤 SB269970) で処理を行う場合には、PRL 処理細胞を用い、培養7日目の時点で DM に各試薬を添加した培地に切り替え、72 時間処理した。

### 3. 定量的 RT-PCR

Total RNA の抽出および cDNA 合成に関する方法は、第一章で示した方法に従

った。

各遺伝子における定量的 RT-PCR には、TaqMan Gene Expression assay (Life technologies 社) および TaqMan Universal Master Mix II (Life technologies 社) を用い、Table 1 に示した容量で混合液を調製し、7500 リアルタイム PCR システム (Life technologies 社) を用いて増幅反応を行った。なお、反応条件は、第一章に示した温度サイクルに従った。各遺伝子の mRNA 発現量は、GAPDH 発現量に対する相対発現量として示した。

Table 5 Reaction mixture for amplifying cDNA by quantitative RT-PCR

Component	Volume ( $\mu$ l)
➤ TaqMan Universal Master Mix II	15
➤ TaqMan Gene Expression Assay	1.5
<i><math>\beta</math>-casein</i> (Hs_00914395_m1)	
<i>5-HTR<sub>1D</sub></i> (Hs_00704742_s1)	
<i>5-HTR<sub>2B</sub></i> (Hs_00168362_m1)	
<i>5-HTR<sub>3A</sub></i> (Hs_00168375_m1)	
<i>5-HTR<sub>7</sub></i> (Hs_04194798_s1)	
<i>GAPDH</i> (Hs_02758991_g1)	
➤ TE buffer	10.5
➤ cDNA solution	3
Total	30 $\mu$ l

#### 4. ウェスタンブロッティング

タンパク質の抽出および定量、ウェスタンブロットに関する手順は、第一章に示した方法に従った。本章で使用した抗体および抗体濃度は、Table 6 に示した。

Table 6 A list of primary and secondary antibodies

Antibody	Product name (company)	Host	Dilution rate
Primary	Anti- $\beta$ -casein, Mouse-mono (Novus Biologicals)	Mouse	1/400
	Anti-STAT5 (phospho Y694) antibody (Abcam)	Rabbit	1/400
	Anti-STAT5 antibody (Abcam)	Rabbit	1/1000
	Anti-5-HT1D Receptor antibody (Abcam)	Rabbit	1/200
	5-HT2B Receptor Antibody (Novus Biologicals)	Rabbit	1/500
	Anti-5-HT3A Receptor antibody (Abcam)	Rabbit	1/500
	Anti-5-HT7 Receptor antibody (Abcam)	Rabbit	1/100
	Anti-GAPDH Mouse mAb (6C5) (Calbiochem)	Mouse	1/2000
Secondary	Goat anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz)	Mouse	1:2000
	Goat anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz)	Rabbit	1:2000

#### 5. 統計解析

多群間の比較では、一元配置の分散分析を行った後、Dunnett's t-test、あるいは Tukey-Kramer test を用いて解析を行い、 $p < 0.05$  の場合を統計的に有意として判定した。

## 第3章 実験の部

### 1. 試薬

セロトニン (5-HT) およびプロラクチン (PRL) は、和光純薬工業より購入した。5-HT<sub>7</sub>受容体の選択的阻害剤 SB269970 は、Abcam 社から購入した。フルボキサミンマレンイン酸塩、パロキセチン塩酸塩、およびセルトラリン塩酸塩は、Sigma-Aldrich 社のものを使用した。その他の試薬は市販の特級品を用いた。

### 2. 細胞培養

#### 2-1) 細胞

MCF-12A 細胞は、第一章で示した方法で入手した。

#### 2-2) 培地調製

本章で使用した培地の調製は、第1章で示した方法に従った。

#### 2-3) Matrigel<sup>®</sup>基底膜マトリックスコートしたディッシュ作製

第1章で示した方法に従った。

#### 2-4) 培養方法

本章で用いた試薬(5-HT、FLV、PRX、SRT、および5-HT<sub>7</sub>選択的阻害剤 SB269970)の処理は、PRL 処理細胞に対して行い、培養7日目に、DM に各試薬を添加した培地に切り替え、72時間培養した。

### 3. ウェスタンブロッティング

タンパク質の抽出および定量、ウェスタンブロットに関する手順は、第一章

に示した方法に従った。本章で使用した抗体および抗体濃度は、Table 7に示した。

Table 7 A list of primary and secondary antibodies

Antibody	Product name (company)	Host	Dilution rate
Primary	Anti- $\beta$ -casein, Mouse-mono (Novus Biologicals)	Mouse	1/400
	Anti-STAT5 (phospho Y694) antibody (Abcam)	Rabbit	1/400
	Anti-STAT5 antibody (Abcam)	Rabbit	1/1000
	Anti-Tryptophan Hydroxylase antibody (TPH1)	Rabbit	1/250
	Anti-Serotonin transporter antibody (Abcam)	Rabbit	1/250
	Anti-GRP78/BiP antibody (Abcam)	Rabbit	1/800
	Anti-GAPDH Mouse mAb (6C5) (Calbiochem)	Mouse	1/2000
Secondary	Goat anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz)	Mouse	1:2000
	Goat anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz)	Rabbit	1:2000

#### 4. 培地中（細胞外）5-HT 量の測定

サンプルの前処理、HPLCによる定量条件および方法、細胞数の計測は、すべて第一章に示した方法に従った。

#### 5. 統計解析

多群間の比較では、分散分析を行った後、Dunnett's t-test、あるいはTukey-Kramer testを用いて解析を行った。また、細胞外5-HT量の経時的変化の評価では、二元配置の分散分析を行った後、Tukey-Kramer multiple testによる解

析を行った。なお、すべての統計解析では、 $p < 0.05$  の場合を有意として判定した。

## 論文目録

本研究内容は、以下の論文に発表した。

- 1) Chiba T, Kimura S, Takahashi K, Morimoto Y, Sanbe A, Ueda H, Kudo K.  
Serotonin suppresses  $\beta$ -casein expression via inhibition of the signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) protein phosphorylation in human mammary epithelial cells MCF-12A.  
*Biol Pharm Bull.* 2014; **37**: 1336-1340.
  
- 2) Chiba T, Kimura S, Takahashi K, Morimoto Y, Maeda T, Sanbe A, Ueda H, Kudo K.  
Serotonin regulates  $\beta$ -casein expression via 5-HT7 receptors in human mammary epithelial MCF-12A cells.  
*Biol Pharm Bull.* 2015; **38**: 448-453.
  
- 3) Chiba T, Maeda T, Kimura S, Morimoto Y, Sanbe A, Ueda H, Kudo K.  
Inhibitory effect of fluvoxamine on  $\beta$ -casein expression via a serotonin-independent mechanism in human mammary epithelial cells.  
*Eur. J. Pharmacol.* 2015; **766**, 56-62.

## 引用文献

- 1) Kramer MS, Chalmers B, Hodnett ED, Sevkovskaya Z, Dzikovich I, Shapiro S, Collet JP, Vanilovich I, Mezen I, Ducruet T, Shishko G, Zubovich V, Mknuk D, Gluchanina E, Dombrovskiy V, Ustinovitch A, Kot T, Bogdanovich N, Ovchinikova L, Helsing E; PROBIT Study Group (Promotion of Breastfeeding Intervention Trial). Promotion of Breastfeeding Intervention Trial (PROBIT): a randomized trial in the Republic of Belarus. *JAMA*. 2001; 285: 413-420.
- 2) Ruiz-Palacios GM, Calva JJ, Pickering LK, Lopez-Vidal Y, Volkow P, Pezzarossi H, West MS. Protection of breast-fed infants against *Campylobacter* diarrhea by antibodies in human milk. *J. Pediatr*. 1990; 116: 707-713.
- 3) Dewey KG, Heinig MJ, Nommsen-Rivers LA. Differences in morbidity between breast-fed and formula-fed infants. *J. Pediatr*. 1995; 126: 696-702.
- 4) Howie PW, Forsyth JS, Ogston SA, Clark A, Florey CD. Protective effect of breast feeding against infection. *BMJ*. 1990; 300: 11-16.
- 5) Ehara T, Kamei Y, Yuan X, Takahashi M, Kanai S, Tamura E, Tsujimoto K, Tamiya T, Nakagawa Y, Shimano H, Takai-Igarashi T, Hatada I, Suganami T, Hashimoto K, Ogawa Y. Ligand-activated PPAR $\alpha$ -dependent DNA demethylation regulates the fatty acid  $\beta$ -oxidation genes in the postnatal liver. *Diabetes*. 2015; 64: 775-784.
- 6) Figueiredo B, Canário C, Field T. Breastfeeding is negatively affected by prenatal depression and reduces postpartum depression. *Psychol. Med*. 2014; 44: 927-936.
- 7) Feng LP, Chen HL, Shen MY. Breastfeeding and the risk of ovarian cancer: a meta-analysis. *J Midwifery Womens Health*. 2014; 59: 428-437.

- 8) Schnatz PF, Marakovits KA, O'Sullivan DM. Assessment of postmenopausal women and significant risk factors for osteoporosis. *Obstet. Gynecol. Surv.* 2010; 65: 591-596.
- 9) Bevan G, Brown M. Interventions in exclusive breastfeeding: a systematic review. *Br. J. Nurs.* 2014; 23: 86-89. Review
- 10) Gartner LM, Morton J, Lawrence RA, Naylor AJ, O'Hare D, Schanler RJ, Eidelman AI; American Academy of Pediatrics Section on Breastfeeding. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics.* 2005; 115: 496-506.
- 11) 平成 17 年度厚生労働省乳幼児栄養調査結果  
(<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2006/06/h0629-1.html>)
- 12) Anderson PO. Drug use during breast-feeding. *Clin. Pharm.* 1991; 10: 594-624.
- 13) Ito S, Lee A. Drug excretion into breast milk--overview. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2003; 55: 617-627. Review.
- 14) 高儀佳代子、恩田光子、岩城晶文、西川直樹、荒川行生. 妊婦・授乳婦の服薬への意識に関する調査研究, 薬学雑誌. 2010; 130: 1281-1285.
- 15) Berle JØ, Aarre TF, Mykletun A, Dahl AA, Holsten F. Screening for postnatal depression. Validation of the Norwegian version of the Edinburgh Postnatal Depression Scale, and assessment of risk factors for postnatal depression. *J. Affect. Disord.* 2003; 76: 151-156.
- 16) Gaynes BN, Gavin N, Meltzer-Brody S, Lohr KN, Swinson T, Gartlehner G, Brody S, Miller WC. Perinatal depression: prevalence, screening accuracy, and screening outcomes. *Evid. Rep. Technol. Assess.* 2005; 119: 1-8.
- 17) Berle JO, and Spigset O. Antidepressant Use During Breastfeeding. *Curr. Womens. Health Rev.* 2011; 7: 28-34.

- 18) Brockington IF. Diagnosis and management of post-partum disorders: a review. *World Psychiatry*. 2004; 3: 89–95.
- 19) Lanza Di, Scalea T, Wisner KL. Antidepressant medication use during breastfeeding. *Clin. Obstet. Gynecol*. 2009; 52: 483–497.
- 20) Poobalan AS, Aucott LS, Ross L, Smith WCS, Helms PJ. Effects of treating postnatal depression on mother-infant interaction and child development. *Br. J. Psychiatry*. 2007; 191: 378–386.
- 21) Appleby L, Warner R, Whitton A, Faragher B. A controlled study of fluoxetine and cognitive behavioural counselling in the treatment of postnatal depression. *BMJ*. 1997; 314: 932–936.
- 22) Boerner RJ and Möller HJ. The importance of the new antidepressants in the treatment of anxiety/depressive disorders. *Pharmacopsychiatry*. 1999; 32: 119–126.
- 23) Suri R, Burt VK, Altshuler LL, Zuckerbrow-Miller J, Fairbanks L. Fluvoxamine for postpartum depression. *Am. J. Psychiatry*. 2001; 158: 1739–1740.
- 24) Wisner KL, Parry BL, Piontek CM. Clinical practice: postpartum depression. *N. Engl. J. Med*. 2002; 347: 194–199.
- 25) Wisner KL, Hanusa BH, Perel JM, Peindl KS, Piontek CM, Sit DK, Findling RL, Moses-Kolko EL. Postpartum depression. A randomized trial of sertraline versus nortriptyline. *J. Clin. Psychopharmacol*. 2006; 26: 353–360.
- 26) Hernandez LL, Collier JL, Vomachka AJ, Collier RJ, Horseman ND. Suppression of lactation and acceleration of involution in the bovine mammary gland by a selective serotonin reuptake inhibitor. *J. Endocrinol*. 2011; 209: 45–54.
- 27) Marshall AM, Nommsen-Rivers LA, Hernandez LL, Dewey KG, Chantry CJ, Gregerson KA, Horseman ND. Serotonin transport and metabolism in the

- mammary gland modulates secretory activation and involution. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2010; 95: 837–846.
- 28) Borellini F and Oka T. Growth control and differentiation in mammary epithelial cells. *Environ. Health. Perspect.* 1989; 80: 85–99.
- 29) Wilde CJ, Addey CV, Boddy LM, Peaker M. Autocrine regulation of milk secretion by a protein in milk. *Biochem. J.* 1995; 305: 51–58.
- 30) Rui H, Lebrun JJ, Kirken RA, Kelly PA, Farrar WL. JAK2 activation and cell proliferation induced by antibody-mediated prolactin receptor dimerization. *Endocrinology.* 1994; 135: 1299–1306.
- 31) Clevenger CV and Kline JB. Prolactin receptor signal transduction. *Lupus.* 2001; 10: 706–718.
- 32) Liu X, Robinson GW, Hennighausen L. Activation of Stat5a and Stat5b by tyrosine phosphorylation is tightly linked to mammary gland differentiation. *Mol. Endocrinol.* 1996; 10: 1496–1506.
- 33) Wagner KU, Krempler A, Triplett AA, Qi Y, George NM, Zhu J, Rui H. Impaired alveologenesis and maintenance of secretory mammary epithelial cells in Jak2 conditional knockout mice. *Mol. Cell. Biol.* 2004; 24: 5510–5520.
- 34) Matsuda M, Imaoka T, Vomachka AJ, Gudelsky GA, Hou Z, Mistry M, Bailey JP, Nieport KM, Walther DJ, Bader M, Horseman ND. Serotonin regulates mammary gland development via an autocrine-paracrine loop. *Dev. Cell.* 2004; 6: 193–203.
- 35) Stull MA, Pai V, Vomachka AJ, Marshall AM, Jacob GA, Horseman ND. Mammary gland homeostasis employs serotonergic regulation of epithelial tight junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007; 104: 16708–16713.

- 36) Marshall AM1, Hernandez LL, Horseman ND. Serotonin and serotonin transport in the regulation of lactation. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*. 2014; 19: 139-146.
- 37) Hernandez LL, Limesand SW, Collier JL, Horseman ND, Collier RJ. The bovine mammary gland expresses multiple functional isoforms of serotonin receptors. *J. Endocrinol.* 2009; 203: 123-131.
- 38) 後藤知己, 小胞体ストレスの分子基盤-細胞内ストレスセンサーとしての小胞体ストレス経路-, 医学のあゆみ. 2006; 216: 857-860.
- 39) Engin F, Nguyen T, Yermalovich A, Hotamisligil G. S. Aberrant islet unfolded protein response in type 2 diabetes. *Scientific Reports*. 2014; 4: 4054.
- 40) Doh SH, Kim JH, Lee KM, Park HY, Park CK. Retinal ganglion cell death induced by endoplasmic reticulum stress in a chronic glaucoma model. *Brain Res*. 2010; 1308: 158 - 166.
- 41) Chen S, Xuan J, Couch L, Iyer A, Wu Y, Li QZ, Guo L. Sertraline induces endoplasmic reticulum stress in hepatic cells. *Toxicology*. 2014; 322: 78-88.
- 42) Isaac R, Boura-Halfon S, Gurevitch D, Shainskaya A, Levkovitz Y, Zick Y. Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) inhibit insulin secretion and action in pancreatic  $\beta$  cells. *J. Biol. Chem.* 2013; 288: 5682-5693.
- 43) Aksamitiene E, Achanta S, Kolch W, Kholodenko BN, Hoek JB, Kiyatkin A. Prolactin-stimulated activation of ERK1/2 mitogen-activated protein kinases is controlled by PI3-kinase/Rac/PAK signaling pathway in breast cancer cells. *Cell Signal*. 2011; 23: 1794-1805.
- 44) Nakamura T1, Ouchida R, Kodama T, Kawashima T, Makino Y, Yoshikawa N, Watanabe S, Morimoto C, Kitamura T, Tanaka H Cytokine receptor common beta

- subunit-mediated STAT5 activation confers NF-kappa B activation in murine proB cell line Ba/F3 cells. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 6254-6265.
- 45) Clark DE, Williams CC, Duplessis TT, Moring KL, Notwick AR, Long W, Lane WS, Beuvink I, Hynes NE, Jones FE. ERBB4/HER4 potentiates STAT5A transcriptional activity by regulating novel STAT5A serine phosphorylation events. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 24175-24180.
- 46) Ueda EK, Huang K, Nguyen V, Ferreira M, Andre S, Walker AM. Distribution of prolactin receptors suggests an intraductal role for prolactin in the mouse and human mammary gland, a finding supported by analysis of signaling in polarized monolayer cultures. *Cell Tissue Res.* 2011; 346: 175-189.
- 47) Schedin PJ, Eckel-Mahan KL, McDaniel SM, Prescott JD, Brodsky KS, Tentler JJ, Gutierrez-Hartmann A. ESX induces transformation and functional epithelial to mesenchymal transition in MCF-12A mammary epithelial cells. *Oncogene.* 2004; 23: 1766-1779.
- 48) Kilic F, Murphy DL, Rudnick G. A human serotonin transporter mutation causes constitutive activation of transport activity. *Mol. Pharmacol.* 2003; 64:440-446.
- 49) Hannon J, Hoyer D. Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav. Brain Res.* 2008; 195: 198-213.
- 50) Pai VP, Marshall AM, Hernandez LL, Buckley AR, Horseman ND. Altered serotonin physiology in human breast cancers favors paradoxical growth and cell survival. *Breast Cancer Res.* 2009; 11, R81.
- 51) Zhang Y, Zhang B. D4-GDI, a Rho GTPase regulator, promotes breast cancer cell invasiveness. *Cancer Res.* 2006; 66: 5592-5598.

- 52) Guseva D, Wirth A, Ponimaskin E. Cellular mechanisms of the 5-HT<sub>7</sub> receptor-mediated signaling. *Front Behav. Neurosci.* 2014; 8: 306. Review.
- 53) Ling L1, Lobie PE. RhoA/ROCK activation by growth hormone abrogates p300/histone deacetylase 6 repression of Stat5-mediated transcription. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 32737-32750.
- 54) Krasilnikov M, Ivanov VN, Dong J, Ronai Z. ERK and PI3K negatively regulate STAT-transcriptional activities in human melanoma cells: implications towards sensitization to apoptosis. *Oncogene.* 2003; 22: 4092-4101.
- 55) Chesnokov V, Gong B, Sun C, Itakura K. Anti-cancer activity of glucosamine through inhibition of N-linked glycosylation. *Cancer Cell Int.* 2014; 28: 45.
- 56) Ohkubo T, Shimoyama R, Otani K, Yoshida K, Higuchi H, Shimizu T. High-performance liquid chromatographic determination of fluvoxamine and fluvoxamino acid in human plasma. *Anal. Sci.* 2003; 19: 859–864.
- 57) Briggs G, Freeman R, and Yaffe S. *Drugs in Pregnancy and Lactation*, 9th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2012, p602-606.
- 58) Hägg S, Granberg K, Carleborg L. Excretion of fluvoxamine into breast milk. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2000; 49: 286–288.