

# ウシ乳腺組織由来の牛乳中副甲状腺ホルモン関連タンパク質 (Parathyroid hormone-related protein; PTHrP) と PTHrP 由来ペプチドの作用

*Function of bovine milk Parathyroid hormone-related protein (PTHrP)*

和田恭則<sup>1</sup>, 伊東正吾<sup>1</sup>, 恩田 賢<sup>2</sup>

<sup>1</sup>麻布大学大学院, <sup>2</sup>麻布大学

Yasunori Wada<sup>1</sup>, Seigo Ito<sup>1</sup>, Ken Onda<sup>2</sup>

<sup>1</sup> AZABU University, Graduate School of Veterinary Science, <sup>2</sup> AZABU University, School of Veterinary Medicine

**Abstract.** Lactating mammary gland has been shown to produce large amounts of parathyroid hormone-related protein (PTHrP), and high levels of PTHrP have been measured in milk; however, the involvement of PTHrP to Ca transport into milk is unknown. Here we report that PTHrP is very likely to participate with active Ca transport to mammary epithelial cells. Bovine mammary epithelial cells were cultured on collagen coated membrane (Transwell, Corning, USA). MBP-bovine PTHrP[1-141](10, 100, and 1,000 fM), CaCl<sub>2</sub> (2.5 mM) and <sup>45</sup>Ca (0.05 μCi/100 μl) were added inside or outside of the membrane and cells were incubated for 1 hour (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Both sides of solution and cells were collected and measured <sup>45</sup>Ca radio activity. Regardless of the side of PTHrP addition, radio activities of <sup>45</sup>Ca were decreased in the added side and not necessarily increased in the opposite side, they were increased in cultured cells. These results suggest that PTHrP produced in the bovine mammary gland participate Ca transport from circulation to milk via Golgi apparatus in the mammary alveolar epithelial cells.

## 1. 目的

泌乳期の乳腺組織で合成される PTHrP は、乳汁中の濃度が著しく高いことから大部分が乳汁中に分泌されると考えられている。しかしその一部は母体の全身循環に入り、母体のカルシウム (Ca) 代謝に何らかの影響を与えることも推測されており (1), PTHrP コンディショナルノックアウトマウスを用いた研究では、母体の骨吸収を促進すると報告されている (2)。また、乳牛の乳汁中 PTHrP 濃度と Ca 濃度との間には有意な正の相関が認められること (3), 山羊に PTHrP を静脈投与すると乳汁中 Ca 濃度が増

加することなども知られており (4), 乳腺組織で合成・分泌される PTHrP が直接乳腺組織の Ca 輸送に関与する可能性も指摘されている。しかしながら、どの報告も PTHrP の Ca 輸送に及ぼす影響を間接的に検討したもので、その実態は明らかとはいえない。

そこで本研究では、チャンバー培養法でメンブレン上にウシ乳腺上皮細胞を初代培養し、PTHrP の乳腺組織における Ca 輸送への関与について *in vitro* で検討した。

## 2. 方法

### チャンバー培養法

ブタ由来タイプI collagen (Cellmatrix Type I-C, 新田ゼラチン, 大阪) にて Transwell (Corning, MA, U.S.A, 24 ウェル用, 直径 6.5 mm, ポアサイズ 0.4  $\mu\text{m}$ ) のポリエステルメンブレンをコートし, 乾燥後 Medium 199 (Earle's salt, Gibco, CA, U.S.A.) で洗浄して酸を取り除き実験に用いた。

### ウシ乳腺上皮細胞の初代培養

ウシの乳腺細胞の初代培養は, Talhouk (5) と古村 (6) の方法を改良して行った。すなわち, ホルスタイン種成雌, 非泌乳期の乳腺組織を採取し, コラゲナーゼなどを含む培養液にて消化後, 数種類のメッシュによるろ過と遠心により培養用の乳腺上皮細胞を得た。乳腺上皮細胞の培養は, まず 10–20 ml の培養液 (Medium 199 Earle's, ペニシリン 100 単位/ml, ストレプトマイシン 100  $\mu\text{g/ml}$ , アンホテリシン B 0.25  $\mu\text{g/ml}$ , インスリン 1  $\mu\text{g/ml}$ , プロラクチン 1  $\mu\text{g/ml}$ , ハイドロコチゾン 0.5  $\mu\text{g/ml}$ , 無血清, 5 mM 酢酸ナトリウム, 0.25 % 牛血清アルブミン, pH7.4) に細胞を再浮遊させ細胞数を算定した後, その細胞数が Transwell 当たり  $10^5/\text{cm}^2$  になるように培養液で調整, 細胞数が適切なことを倒立顕微鏡下でも確認した後, 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ , 95 % 大気条件下で

培養した。Transwell メンブレン上の乳腺上皮細胞の状態がほぼコンフルエントになった時点で, 水平方向と垂直方向の両面について組織学的に確認したところ, 水平方向ではほぼ一様に細胞が配列しメンブレンを覆っていた。また垂直方向でも, メンブレン上に隙間なく一層の細胞群として観察された (図 1)。

### チャンバー培養法による Ca 輸送の検討

乳腺上皮細胞が Transwell のメンブレン上でほぼコンフルエントになった時点で Transwell の内外両側の培養液を除去し, 新しい培養液に MBP-ウシ PTHrP [1-141] がそれぞれ 10 fM, 100 fM, 1,000 fM, および  $\text{CaCl}_2$  2.5 mM と  $^{45}\text{Ca}$  (0.05  $\mu\text{Ci}/100 \mu\text{l}$ ) になるように調整して, PTHrP の Ca 輸送に及ぼす影響を観察した。すなわち, Transwell の内側に PTHrP ならびに  $^{45}\text{Ca}$  を添加する場合には 100  $\mu\text{l}$  とし, Transwell の外側には培養液を 600  $\mu\text{l}$  加えた。これとは反対に Transwell の外側に PTHrP ならびに  $^{45}\text{Ca}$  を添加する場合には 600  $\mu\text{l}$  とし, 内側に培養液を 100  $\mu\text{l}$  加えた。PTHrP ならびに  $^{45}\text{Ca}$  を添加した後, 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ , 95 % 大気圧下で 1 時間反応させた。反応終了後 Transwell の内側と外側から培養液を全量採取し, Scintisol (Dojin, Japan) 10 ml を加えて混和し, シンチレーター (LSC-5100, アロカ, 日本) でその放射活性を測定した。また細胞内の  $^{45}\text{Ca}$  については Transwell の内外両側を PBS (-) で 3 回洗浄後,

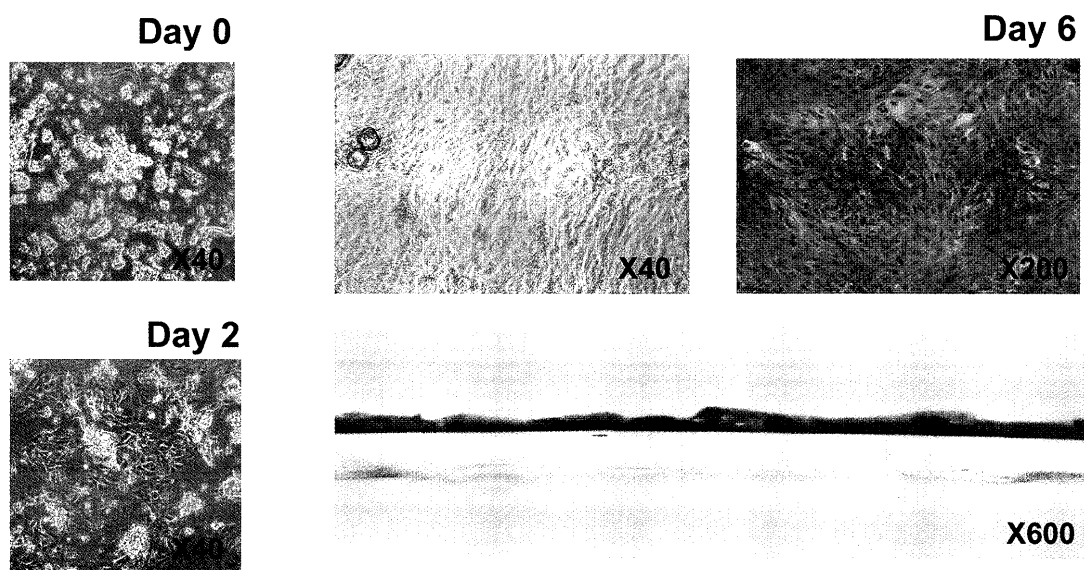


Figure 1. Primary culture of non-lactating bovine mammary epithelial cells on chamber membrane at Day 0, 2 and 6. Images of phase contrast and HE stain.

1% SDSを含む培養液 100  $\mu$ lで細胞を溶解し、Scintisol 10 mlを加えて良く混和してからその放射活性を測定した。また、それぞれに同一モル濃度のMBP添加と、培養液のみ (PTHrPも  $^{45}\text{Ca}$ も添加せず)の二つのコントロールを設定し比較検討した。

### 3. 結果と考察

添加する MBP-ウシ PTHrP [1-141] の濃度を 10, 100, 1,000 fM として検討した結果を図2に示した。Transwell 内側のチャンバーにそれぞれの濃度の PTHrP と、標識した Ca を添加し 1 時間反応させた場合 (図2, A), 内側のチャンバー内培養液中の放射活性は減少する傾向にあり, PTHrP を 100 fM 添加した時にはその差は有意なものであった (図2, A 中段)。その際に外側への放射活性の移動は必ずしも増加しないのに対して (図2, A 上段), 細胞内への蓄積は

PTHrP を 100 fM と 1000 fM 添加した場合に有意に増加していた (図2, A 下段)。一方, Transwell 外側のチャンバーにそれぞれの濃度の PTHrP と標識した Ca を添加した場合には (図2, B), 外側のチャンバー内培養液中の放射活性は減少する傾向にあり, 10 ならびに 1,000 fM の濃度の PTHrP を添加した時に有意であった (図2, B 上段)。その際に, チャンバー内側の培養液中の放射活性は必ずしも上昇することがなかったのに対して (図2, B 中段), 細胞内の放射活性は PTHrP を 100 fM 添加した場合には有意に増加した (図2, B 下段)。

乳腺組織における PTHrP の Ca 輸送に対する作用については標識した Ca を用いた研究で, Ca はカゼインなどのタンパク質と同様乳腺上皮細胞に取り込まれ, 細胞質とゴルジ装置を経て, 乳汁中に速やかに分泌されると報告されおり (7), その際細胞質内

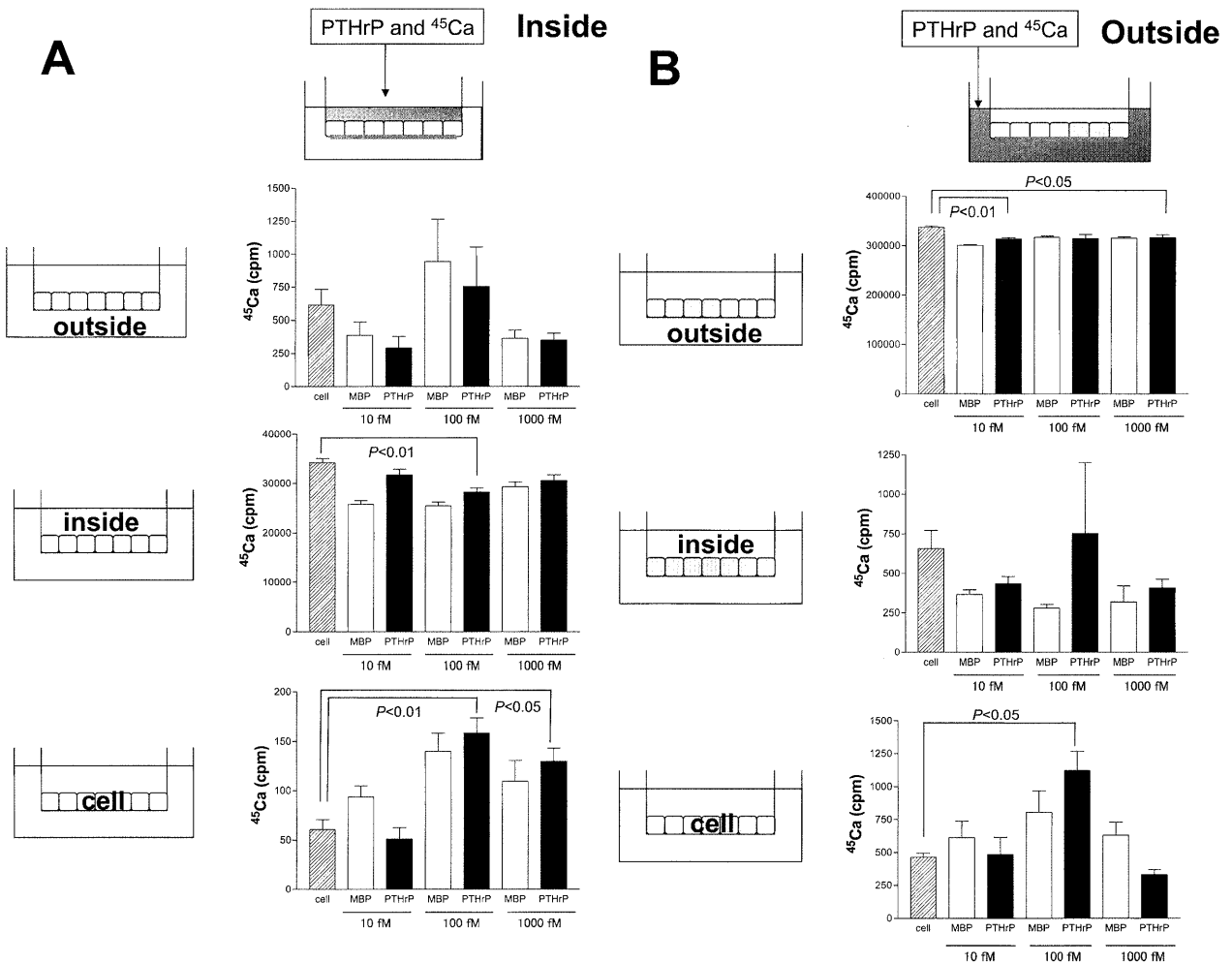


Figure 2. PTHrP influence to Ca transport on cultured bovine mammary epithelial cells. PTHrP and  $^{45}\text{Ca}$  were added to inside (A) or outside (B) of the chamber.

の Ca 濃度は他の細胞と同様に低値に維持されることが知られている (8)。また, Prapong (9) は乳熱に罹患するウシでは分娩前に乳腺組織における分泌系  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 1 型の発現量が非罹患牛より有意に高いことを報告した。このカルシウムチャンネルは乳腺細胞内のゴルジ装置に特異的に存在することから, 大量の泌乳に備えカルシウムを一時的にゴルジ装置に貯蔵し, 細胞質のカルシウム濃度を低く維持することに貢献するとしている。前述したように山羊においては PTHrP が乳汁中の Ca 濃度を増加させるとの報告があるのに対して, PTHrP コンディショナルノックアウトマウスを用いた研究では初代培養乳腺上皮細胞への Ca 取り込み量に差の認められないことから, PTHrP が乳腺組織における Ca の輸送に直接関与しないとしている (10)。しかしながら, 本研究の結果では内側外側にかかわらず, PTHrP を添加した側の標識 Ca の放射活性は減少するのに対して, 必ずしも反対側の放射活性はそれに対応して上昇してはいなかった。そしてその際, 有意に標識 Ca の放射活性が上昇するのは細胞内であり, それはおそらくゴルジ装置に蓄積することを意味するものと思われる。ただし, 本チャンバー法では標識 Ca の移動方向は確認できるものの, その量的変動を考える上では Transwell メンブレン上に培養された細胞の極性とその構成比率を考慮する必要があると思われた。

以上のことから, 今後 PTHrP の添加濃度や反応時間はさらに検討する必要があるものの, PTHrP がゴルジ装置への Ca 輸送という経路に作用することにより, 血液中から乳汁中へのカルシウム輸送に関与していることが示唆された。

#### 4. 要 約

乳腺組織由来の PTHrP は乳汁中への Ca 輸送に関与する可能性があるため, 乳腺組織における PTHrP の Ca 輸送に対する作用を, 初代培養ウシ乳腺上皮細胞をコラーゲンコートしたメンブレン上で培養し,  $^{45}\text{Ca}$  の輸送について *in vitro* の系で検討した。非泌乳期のウシ乳腺組織をコラゲナーゼで消化し, プロラクチン, インスリン, ハイドロコルチゾンの存在下で培養して乳腺上皮細胞を得た。得られた乳腺上皮細胞をチャンバー法にて培養し,  $^{45}\text{Ca}$  を内側あるいは外側のチャンバーに加え, PTHrP を添加した際の外側あるいは内側チャンバー溶液中の  $^{45}\text{Ca}$  放射活性を測定した。その結果, 内側外側にかかわらず, PTHrP を添加した側の標識 Ca の放射活性は減少するのに対して, 反対側の放射活性はそれに対応して必ずしも上昇するわけではなく, 細胞内の標識 Ca 放射活性が上昇することが分かった。この結果は, PTHrP が乳腺上皮細胞のゴルジ装置への Ca 輸送に作用することにより, 血液中から乳汁中へのカルシウム輸送に関与していることを示唆するものであった。

#### 文 献

- 1) Ratcliffe *et al.*, 1992. J. Endocrinol. 133: 87-93.
- 2) VanHouten *et al.*, 2003. J. Clin. Invest. 112: 1429-1436.
- 3) Onda *et al.*, 2006. J. Vet. Med. Sci. 68: 709-713.
- 4) Barlet *et al.*, 1992. J. Endocrinol. 132: 353-359.
- 5) Talhouk *et al.*, Tissue and Cell 22: 583-599.
- 6) 古村恵子, 1993. 栄養生理研究会報 37: 87-114.
- 7) Neville *et al.*, 1979. J. Physiol. 290: 59-67.
- 8) Duncan *et al.*, 1996. Biochem. J. 317: 487-493.
- 9) Prapong *et al.*, 2005. J. Dairy Sci. 88: 1741-1744.
- 10) VanHouten *et al.*, 2004. J. Clin. Invest. 113: 598-608.