

牛乳中に含まれる副甲状腺ホルモン関連タンパク質 (PTHrP) の意味

*Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) derived
from the lactating mammary gland of cattle*

和田恭則, 伊東正吾, 恩田 賢

麻布大学

Yasunori Wada, Seigo Ito, Ken Onda

AZABU University

Abstract. To investigate the roles of PTHrP derived from the mammary gland of cattle, plasma PTHrP and Ca levels, and their arterial-venous differences were examined in a Jersey cow during the periparturient period. Levels of Ca in both abdominal aorta and subcutaneous vein of abdomen blood slightly decreased around the parturition and at 24 days after parturition, however, no remarkable arterial-venous differences were observed. Plasma PTHrP levels in both arterial and venous samples were below the detection limit (0.57 pM) during the experimental period. Milk PTHrP and Ca levels were measured in 9 Holstein dairy cows. Although plasma PTHrP levels in all arterial and venous samples were also below the detection limit, milk PTHrP and Ca levels were high, ranging from 14.9 nM to 41.2 pM and from 77.2 mg/dl to 120 mg/dl, respectively. In addition, a significant positive correlation ($P < 0.01$) was observed between milk PTHrP and milk Ca levels. In conclusion, we collected blood from one Jersey cow with time around parturition and from 9 Holstein cows those had different lactation stages and milk production, secreted plasma PTHrP from the lactating mammary gland would not detect even in subcutaneous veins of abdomen which lies downstream of the mammary gland. However, milk concentration of PTHrP was remarkable high and almost (90 % <) derived from the mammary gland in cattle. We could not demonstrate that the lactating mammary gland secrete PTHrP into a peripheral circulation in cattle, though milk contains large amount of PTHrP as a protein and the meaning stay to be elucidated.

1. 目的

ウシの乳腺組織ではPTHrPが合成・分泌され、またPTH/PTHrPレセプター遺伝子が発現していることから、乳腺組織でのPTHrPはオートクラインあるいはパラクラインで、乳腺組織に何らかの作用することが推測されている。Ratcliffeら(1)は山羊の血中PTHrP濃度には乳腺組織の動静脈間で差が認められ、乳腺組織で産生されたPTHrPは乳汁中のみならず、

母体の全身循環にも分泌されると報告している。しかしながら、血中PTHrP濃度は乳汁中に比較して著しい低値である。Lawら(2)やSekiら(3)は、ウシやヒトの乳汁中のPTHrP濃度が乳汁中Ca濃度と関連することから、PTHrPは乳腺組織におけるCa輸送に作用すると推測している。その一方で、乳汁中PTHrP濃度は乳汁中Ca濃度とは相関しないとする報告もあり(4)、乳腺組織におけるPTHrPの作用は明確でない。そこで本研究ではリコンビナントウシ

PTHrP [1-141] を合成し、これをスタンダードとして PTHrP, および Ca の乳腺組織における動静脈差, ならびに乳汁中のそれぞれの濃度を測定し, その関係について検討した。

2. 方法

血液ならびに乳汁検体の採取

周産期の動静脈差を検討したジャージー種乳牛では, 分娩前 25 日から分娩後 31 日までは毎週, それ以降 115 日後までは 2 週間に 1 回血液を採取した。乳汁中の PTHrP 濃度と Ca 濃度との関連を検討した泌乳期ホルスタイン種乳牛 9 頭からは乳汁を採取した日に血液を 1 回採取した。血液は乳腺の上流である腹大動脈と下流である腹皮下静脈から採取した。

ウシ PTHrP [1-141] の作成

ウシ PTHrP [1-141] cDNA を発現ベクター pMAL c2E にサブクローニングし, 大腸菌 BL21 にトランスフォームし, 振盪培養した。IPTG で発現誘導後大腸菌を回収し, 超音波で破碎後遠心し, 上清を回収しアミロースレジンにて MBP-ウシ PTHrP [1-141] を精製した。

PTHrP 濃度の測定

血漿と乳汁中の PTHrP 濃度は市販のキット (PTHrP IRMA 「ミツビシ」, 三菱化学ヤトロン, 東京) を用いて, 前述した MBP-ウシ PTHrP [1-141]

をスタンダードとして測定した。MBP-ウシ PTHrP [1-141] 濃度は 2.27 pM までは定量性を認め, また検出限界は 0.57 pM であった。乳汁中 PTHrP 濃度の測定には, 解凍した乳汁をボルテックスでよく攪拌した後, 本キットの測定範囲 (1-100 pM) に入るように Ratcliffe らの方法 (1) を参考に作成した希釈液で, 400 倍希釈して測定した。

3. 結果と考察

Figure 1 に周産期のジャージー種乳牛における血漿 PTHrP 濃度ならびに血清 Ca 濃度の推移と乳腺組織の動静脈差を示した。血清 Ca 濃度は周産期に大きな動静脈濃度の差は観察されなかったが, 分娩当日と分娩 24 日後に動静脈血ともにやや減少した。この減少時には静脈血 Ca 濃度が高い傾向が観察された。血漿 PTHrP 濃度は動脈ならびに静脈血のいずれにおいても観察した試験期間中, 検出限界の 0.57 pM 以下の値を示し, 動静脈差は検討することが出来なかった。

乳汁中 PTHrP 濃度と Ca 濃度を検討した 9 頭のホルスタイン種乳牛においても, 動脈ならびに静脈血漿中 PTHrP 濃度は検出限界以下であった (Table 1)。一方, 乳汁中 PTHrP 濃度は 28.4 ± 7.6 nM (平均±標準偏差) (範囲: 14.9-41.2 pM) と, 著しい高値を示した。乳量や乳比重, 乳腺組織への血液還流量を元

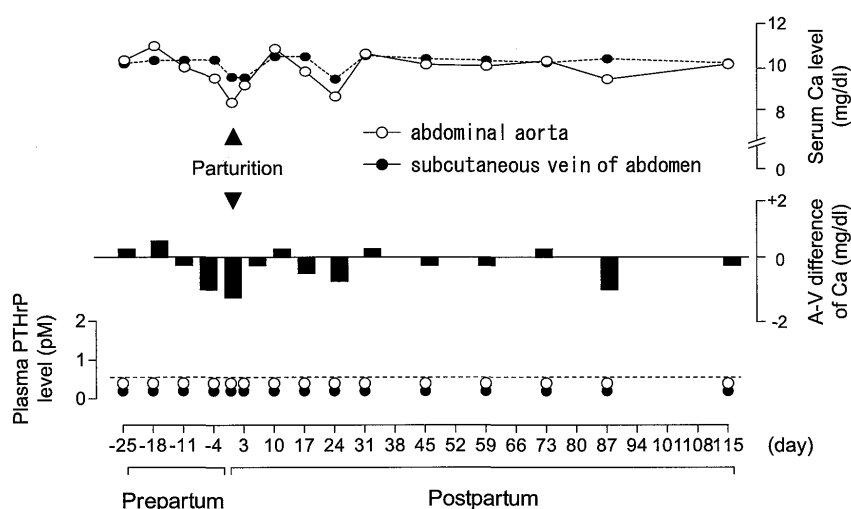


Figure 1. Plasma PTHrP and serum Ca levels, and those arterial-venous differences in periparturient period of a Jersey cow. Although serum Ca levels decreased transiently around the parturition and at 24 days after the parturition, no remarkable arterial-venous differences were observed. Plasma PTHrP levels in both arterial and venous blood were below the detection limit (0.57 pM).

Table 1. Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) levels in abdominal aorta, subcutaneous vein of abdomen blood and milk, and Ca levels in milk of 9 lactating Holstein cows

Cow No.	PTHrP concentration (pM)			Ca concentration (mg/dl)
	Abdominal aorta	Subcutaneous vein of abdomen	Milk	Milk
1 (pooled)*	< 0.57	< 0.57	14,900	95
2 (pooled)	< 0.57	< 0.57	28,600	107
3 (pooled)	< 0.57	< 0.57	28,300	99.8
4 (pooled)	< 0.57	< 0.57	37,500	120
5 (pooled)	< 0.57	< 0.57	24,500	88.9
6 (pooled)	< 0.57	< 0.57	27,600	105
7-1 (LA)	-	-	17,300	77.2
7-2 (LP)	-	-	17,300	81.8
8-1 (RA)	-	-	31,200	106
8-2 (LA)	-	-	41,200	104
8-3 (LP)	-	-	35,100	110
9 (pooled)	-	-	23,700	8509

*: pooled (pooled from 4 quarters), LA (left anterior quarter), LP (left posterior quarter) and RA (right anterior quarter) milk

に計算をしたところ、乳腺組織から分泌される PTHrP の 90% 以上が乳汁中へと分泌されており、残りの数%が抹消循環に入っているものと考えられた。また乳汁中 Ca 濃度も 98.7 ± 13.3 mg/dl (平均±標準偏差) (範囲: 77.2-120 mg/dl) と血中 Ca 濃度の約 10 倍の高値であった。Figure 2 に乳汁中 PTHrP 濃度と乳汁中 Ca 濃度の関係を示した。その結果、乳汁中 PTHrP 濃度と Ca 濃度とは有意な ($P < 0.01$) 正の相関が認められ、乳腺組織で産生し分泌された PTHrP がオートクラインあるいはパラクラインで乳腺組織自身に作用し、Ca 輸送に影響している可能性が示唆された。

泌乳期乳腺組織の PTHrP をノックアウトしたコンディショナルノックアウトマウスを用いた解析からは、乳腺組織で産生された PTHrP が末梢血に放出され、骨吸収を刺激すると報告されている (5)。ウシを用いた本研究では、分娩前後どのステージにおいても、また頸静脈と腹大動脈、乳静脈のいずれにおいても、PTHrP を検出することは出来なかった。今回の測定法によるウシ PTHrP の検出下限値を考慮しても、この結果はコンディショナルノックアウトマウスにおける報告を支持するものではなく、ウシにおいては骨吸収への関与を確認することは出来なかった。

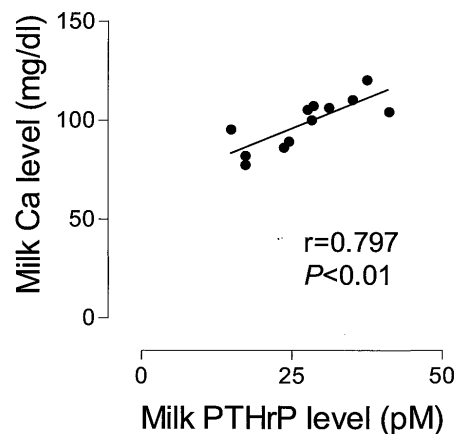


Figure 2. Correlation between milk PTHrP and Ca levels in cows.

The significant positive correlation was observed between PTHrP and Ca levels in milk ($P < 0.01$).

4. 要約

乳牛の乳腺組織では PTHrP が合成・分泌され、またそのレセプターである PTH/PTHrP レセプターが発現していることから、PTHrP が乳腺組織において何らかの作用を有する可能性が考えられた。そこで本研究では、乳汁中の PTHrP 濃度と Ca 濃度との関連を検討した。最初に MBP-ウシ PTHrP [1-141] を合成し、スタンダードとして用いて血漿中ならびに乳

汁中 PTHrP 濃度を測定した。まず、周産期のジャージー種乳牛 1 頭を用いて、PTHrP の乳腺組織からの分泌、ならびに Ca の乳腺組織への取り込みについて検討した。すなわち、腹大動脈と腹皮下静脈（乳静脈）から血液を採取し、PTHrP 濃度と Ca 濃度を測定し、動静脈差を求めた。血清 Ca 濃度はこれまでの報告と同様に分娩前後に一過性の減少が認められたが、その低下時に Ca 濃度の動静脈差は認められず、乳腺への取り込みは明らかではなかった。一方、血漿中 PTHrP 濃度はいずれの時期においても検出限界以下 (0.57 pM) で、動静脈差を検討することはできなかった。ついでホルスタイン種泌乳牛 9 頭について血漿中 PTHrP の動静脈差を検討するとともに、乳汁中の PTHrP と Ca 濃度について検討した。その結果、血漿中 PTHrP 濃度は動静脈共に周産期のそれと同様、検出限界以下であった。一方、乳汁中の PTHrP 濃度は著しく高く、 28.4 ± 7.6 nM (平均±標準偏差) であり、90%以上が乳腺組織由来であることが明らかとなった。また乳汁中 Ca 濃度は 98.7 ± 13.3 mg/dl

(平均±標準偏差) であり、乳汁中の PTHrP 濃度との間には有意な正の相関 ($P < 0.01$) を認め、乳腺組織由来の PTHrP が、乳汁への Ca 輸送に参与している可能性が示唆された。

文 献

- 1) Ratcliffe, W. A., Thompson, G. E., Care, A. D., and Peaker, M. *Journal of Endocrinology* 133: 87-93. 1992.
- 2) Law, F. M., Moate, P. J., Leaver, D. D., Diefenbach-Jagger, H., Grill, V., Ho, P. W., and Martin, T. J. *Journal of Endocrinology* 128: 21-26. 1991.
- 3) Seki, K., Kato, T., Sekiya, S., Makimura, N., Kudoh, K., Furuya, K., and Nagata, I. *Gynecologic and obstetric investigation* 44: 102-106. 1997.
- 4) Yamamoto, M., Fisher, J. E., Thiede, M. A., Caulfield, M. P., Rosenblatt, M., and Duong, L. T. *Endocrinology* 130: 741-747. 1992.
- 5) VanHouten, J. N., Dann, P., Stewart, A. F., Watson, C. J., Pollak, M., Karaplis, A. C., and Wysolmerski, J. J. *Journal of Clinical Investigation* 112: 1429-1436. 2003.