

ヒト乳腺上皮細胞シートのイオン透過性に対するヒスタミン受容体阻害剤の影響

葛西 裕亮 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 岡村 直道 (筑波大学 医学医療系)

背景と目的

仔の数や成長に応じた泌乳量の調節は、哺乳動物の生殖戦略の根幹となる仕組みのひとつである。このオン・デマンドなミルクスタシス (泌乳維持機構) は、搾乳刺激への神経内分泌的な応答である射乳反射機構によって説明されることが多い。しかし、乳腺局所における情報処理もミルクスタシスに重要な働きを担っている^{文献1}。

ヒスタミンはそうした乳腺局所で働く情報因子の有力候補のひとつである^{文献2}。ヒスタミン合成を担うヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) の遺伝子欠損マウスでは母親の泌乳不全が原因で仔に著しい成長不良を生じる。いくつかの証拠から乳腺自体のHDCおよびヒスタミンが、ミルクスタシス (泌乳維持機構) に関与している可能性が示唆されている。一方、HDC欠損マウスの乳汁成分の解析から、K/Naイオン比が小さいことがわかった。通常は出産後に乳腺上皮の密着結合 (TJ) の緊結に伴い、乳汁中 K/Naイオン比の増大と乳腺上皮の分泌活性化が起こる。TJはイオンの透過性を調節することから、HDC欠損乳腺ではTJ形成不全が泌乳不全の原因となっている可能性が考えられる。初代培養系を用いた研究では、ヒスタミン受容体の阻害により、乳腺上皮のイオン透過性が上昇することがわかり、乳腺自体のヒスタミン情報伝達が乳腺生理に重要な働きを担っている可能性が示唆された。しかし、この実験系では混入した乳腺上皮以外の細胞の影響を否定できなかった。

そこで本研究では、(1) 乳腺上皮にヒスタミンの自己傍分泌に必要な分子が発現しているか、(2) このヒスタミン情報伝達系が乳腺上皮TJの機能調節に影響力を持っているか、を確かめることを主な目的として、他の細胞成分の影響を無視できる株化されたヒト乳腺上皮由来細胞 (hMEC) を用いた実験系でヒスタミン受容体の発現やイオン透過性やTJ形成に対するヒスタミン受容体阻害剤の影響を調べた。

材料と方法

[細胞培養と膜透過性の測定]

hMECを12穴Transwell™プレート内、5%CO₂、37°C環境下で極性培養した。上皮細胞シートのイオン透過性は、EVOM2を用いて測定した上皮膜電気抵抗 (TEER) を指標とした。

[阻害剤]

1型ヒスタミン受容体 (H₁) 阻害剤 trans-triprolidine, H₂阻害剤 rantidine, H₃/H₄阻害剤 thioperamide, ヒスタミン細胞内受容体 (H_{1c}) 阻害剤 DPPE を、終濃度 100 μM で基底側培地に添加した。p38MAPK阻害 SB203580 は終濃度 3 μM で基底側培地に添加して行なった。

[TJタンパク質の検出]

培養細胞に SDS 溶液を加えて細胞を溶解し、タンパク質を5%または15%ゲルのSDS-PAGEで分画、PVDF膜への転写し、TJ関連タンパク質を免疫ブロッティング法により検出した。ウサギ抗hCldn1抗体 (1:1000) などの一次抗体と反応後、アルカリホスファターゼ標識二次抗体およびBM Purpleにより発色検出した。

[定量的PCR]

培養細胞をIsogenに懸濁し、全RNAを抽出した。ReverTra Ace およびThunderbird SYBR qPCR Kitを用いてcDNA合成およびその増幅をし、Rps15遺伝子産物を基準としたΔΔCT法によりmRNA発現量を推定した。

結果と考察

hMECを極性培養した結果、培養開始から2週間程でTEERが増加し始め、4週間程でTJが形成されたhMECシートを得ることができた。この細胞を用いてまず、4種類のヒスタミン細胞膜受容体 mRNA について、hMECにおける発現の有無をqPCR法で調べた。その結果、すべての種類の受容体の発現が確認された。HDCのmRNAの発現も認められ、乳腺上皮におけるヒスタミン自己傍分泌系の存在を支持する結果が得られた。

次にhMECを4種類の選択的ヒスタミン受容体阻害剤で72時間処理して、TEERの変化を調べた。その結果、H₁およびH_{1c}阻害剤によりTEERが有意に低下した。さらに、この阻害剤処理後、阻害剤非添加の培地で培養を続けるとTEERは回復した。このことから、H₁およびH_{1c}はhMECシートのイオン透過性の低下に寄与していることが示唆された。

ここで観察されたイオン透過性の変化は、TJの構成などが変化したためではないかと考え、TJ形成及びその調節に関与する報告のある約50種類のタンパク質 mRNA の発現について、H_{1c}阻害剤処理による変化を調べた。その結果、Tjp1 mRNA の発現量増加とCldn1 mRNA の発現量低下が認められるなど、H_{1c}阻害による影響が認められた。このことは、TJ関連遺伝子の発現にH_{1c}を介したヒスタミンシグナルが影響力をもっていることを示すものである。

さらに、代表的なTJ構成タンパク質であるCldn1, Ocldn, Tjp1について、タンパク質レベルでの発現に対するH_{1c}阻害剤処理の影響を調べた。その結果、Tjp1とCldn1の発現低下が認められた。この結果は、H_{1c}機能がTjp1とCldn1の発現維持に貢献していることを示唆している。さらには、ヒスタミンがそれを通じてTJによる上皮イオン透過性の減少に寄与しているものと期待される。Tjp1では、H_{1c}阻害によるmRNAの増加とタンパク質の減少が同時に観察されたことからTjp1タンパク質の代謝回転が速くなっている可能性が考えられる。

乳腺Tjp1タンパク質の発現にはp38MAPKが関与しているとの報告があるため、今回のH_{1c}阻害剤によるTjp1タンパク質の発現低下とTEER低下へのp38MAPKの関与を調べた。まず、H_{1c}阻害剤処理によりp38MAPKのリン酸化が亢進することを明らかにした。次に、p38MAPKの阻害剤存在下では、H_{1c}阻害剤がTjp1タンパク質の発現量に影響を与えないことがわかった。さらに、p38MAPKの阻害剤存在下では、H_{1c}阻害剤はTEER低下作用を示さないことが判明した。これらの結果は、H_{1c}阻害剤がp38MAPKの活性化を介してTjp1タンパク質の量を減少させ、hMECシートのイオン透過性を増大させることを示唆するものである。

本研究から、ヒスタミンがH₁およびH_{1c}受容体を介して乳腺上皮細胞に直接作用し、TJの形成とイオン透過性の調節に関与していることが、強く示唆された。また、H_{1c}受容体を介したヒスタミンシグナルが、Cldn1やTjp1のタンパク質の発現を支えていることと、その発現調節の仕組みの一端が明らかとなった。乳腺上皮には、ヒスタミンによる局所シグナル伝達機構が機能しており、TJ形成を通じてミルクスタシスを支えているものと期待される。

参考文献:

¹Matsuda M., et al. (2004) *Dev Cell* 6:193-203.

²Matsuda M., et al. (2007) *J Reprod Dev* 53:60-61.