

母乳分泌における脂質濃度調節機構の解析 —乳腺組織における核内受容体群のクロストーク機構—

瀧谷 公 隆
大阪医科大学小児科 講師

緒 言

近年、日本での食習慣の欧米化において、日本人の栄養障害は、摂取不足からその栄養摂取の不均衡へと変遷している。特に幼少児・子供・若年成人において、栄養摂取の不均衡は懸念すべき問題である。妊娠中あるいは授乳期の女性の栄養状態は非常に重要であり、その不摂生は胎児および乳児に影響する可能性がある。しかし、母体の栄養摂取状態が、胎児あるいは母乳成分に与える影響を分子生物学的に検討した報告は数少ない。

母乳は、乳児にとってただひとつの完全な食事である。母乳は十分な栄養成分のみでなく、感染防御物質（分泌型IgA、アルブミン、免疫グロブリン、ラクトフェリン、リゾチームなど）を有する。そのため、腸内細菌叢の発達に寄与する。母乳の最重要な意義として、健全な母子相互関係の確立がある。これはその後の乳児の健全な心身発達に重要な影響を与える。

母乳の構成成分は、授乳期により変化することが知られている。授乳期の経過とともに、母乳中のタンパク質、ミネラル成分は顕著に減少し、逆に乳糖および脂肪成分は上昇する。これは、乳児の発育にあわせて、必要成分量が変化するためと考えられる。またこのような母乳の各成分の分泌調節機構は不明である。脂溶性ビタミン群も同様に母乳中に含まれ、授乳を通じて乳児に供給される。成熟母乳中の脂溶性ビタミン濃度は、授乳時期により異なる。特に脂溶性ビタミンであるビタミンEは初乳に多く含まれるが、その母乳分泌の調節機構は不明である。生体における脂質代謝は、肝臓、脂肪、マクロファージなどの組織において、複数の遺伝子群により複雑に制御されている。なかでも核内受容体群PPAR $\alpha \cdot \delta \cdot \gamma$ (peroxisome proliferators - activated receptor) およびLXR(liver X receptor)などは、主要な転写調節因子である。

ビタミンEは生体内で強い抗酸化能を有する。ビタミンEにはトコフェロールおよびトコトリエノールが

存在し、それぞれ $\alpha \cdot \beta \cdot \gamma \cdot \delta$ の同族体が存在する¹⁾²⁾。中でも α -トコフェロールが最も抗酸化作用が強い。ビタミンEは小腸から吸収されてキロミクロンに結合して肝臓に取り込まれる。肝臓では α -トコフェロールが α -トコフェロール輸送蛋白質(α -TTP: α -tocopherol transfer protein)と特異的に結合し、その後VLDLに組み込まれて、血液中に再び放出される。血液中の α -トコフェロールと結合したVLDLは代謝されてLDLとなる。こうして α -トコフェロールは各末梢組織に運搬され、LDL受容体を介して細胞内に取り込まれる。肝臓中 α -TTPの主な作用は、血液中 α -トコフェロール濃度を維持することである。すなわち α -TTPの機能不全では、 α -トコフェロールを体内に蓄積することができず、ビタミンE欠乏状態を呈することになる。 α -TTP遺伝子は、家族性特発性ビタミンE欠乏症(AVED: ataxia with isolated vitamin E deficiency)の原因遺伝子である³⁾⁴⁾。AVEDの主な臨床症状は、運動失調、深部感覚障害であり、網膜色素変性症を伴うこともある⁵⁾。

本研究では、まず脂溶性ビタミンであるビタミンEの乳腺組織における代謝を研究するために、乳腺細胞における α -TTP遺伝子発現を検討した。さらにこの発現と共に、脂溶性生理活性物質をリガンドする転写因子である核内受容体により母乳中のビタミンE濃度が変化するかどうかを検討した。

実験方法

1. ヒト乳腺細胞 MCF-10 の培養

乳腺線維嚢胞細胞株(MCF-10)を使用した。MCF-10細胞は、American Type Culture Collection社より購入した。MCF-10の培養条件として、DMEM/F12(FBS10%、インスリン5mg/500ml、EGF10 μ g/500ml、ヒドロコルチゾン250 μ g/500ml、ペニシリン)を用いた。培地交換は、70~80%コンフルエントの状態で行った。

2. real-time RT PCR 法による mRNA 発現量の検討

MCF-10 細胞に各種の脂溶性リガンドを添加し、1～2 日後に細胞を回収した。回収した培養細胞から RNA 抽出 (Qiagen) を行い、total RNA を採取した。得られた total RNA (2 μ g) について、逆転写 (Omniscript, Qiagen) を行い、cDNA を合成した。合成した cDNA を real-time PCR の鋳型として用いた。Real-time PCR は、Hybprobe Master Mix (Roche) を用いて、Light Cycler System (Roche) で PCR 反応を施行した。対象とした遺伝子は、ヒト α -TTP および β -Actin 遺伝子である。

3. 授乳ラットに対する脂溶性リガンド投与でのビタミン E 濃度の検討

Wistar 雌ラット (15 週) を出産後より、10 匹の仔ラットに授乳させた。出産後 17 日に脂溶性物質 (核内受容体 LXR のリガンド) である T0901317 (5 mg/kg) の単回経口投与を行った。そして 24 時間後に母体血および母乳の採取を行った。そして、母体血および母乳のビタミン E 濃度を測定した。なおビタミン E 濃度の測定は

既報に従った。

結 果

1. 乳腺線維嚢胞細胞株 (MCF-10) での実験

乳腺線維嚢胞細胞株 (MCF-10) において、 α -TTP 遺伝子発現を PCR にて確認した。脂質代謝に関係する転写因子 (核内受容体) である LXR (Liver X receptor) のリガンド 22(R)-hydroxycholesterol により、 α -TTP 遺伝子発現が上昇することを見いだした (図 1)。またリガンド濃度依存的に、 α -TTP 遺伝子発現は上昇した (図 2)。

2. 授乳ラットに対する脂溶性リガンド投与でのビタミン E 濃度

Wistar 雌ラット (17 週齢、出産後 17 日) に LXR リガンドである T0901317 (5 mg/kg) の単回経口投与を行った。24 時間後に検体を採取し、 α -トコフェロール濃度を測定した。その結果、血液中 α -トコフェロール濃度は上昇し、母乳中 α -トコフェロール濃度は減少した (図 3)。

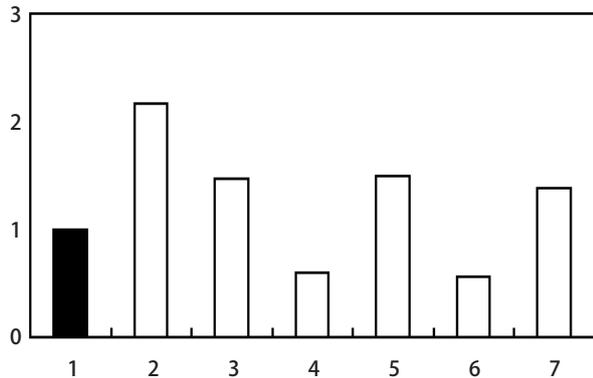


図 1 MCF-10 培養細胞での α -TTP 遺伝子発現 (脂溶性リガンド添加実験)

1. Control 2. 22(R)Hydroxy Cholesterol 3. Leptin 4. Carbacyclin
5. Pioglitazone 6. WY14643 7. GW0742

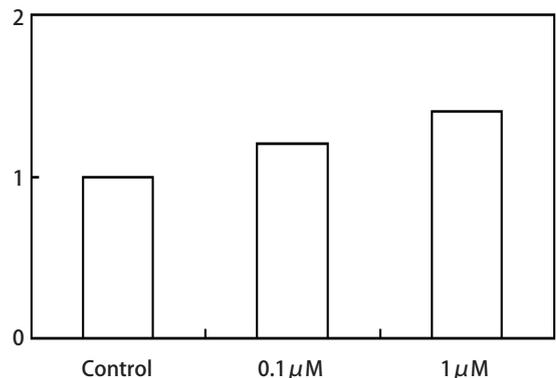


図 2 MCF-10 培養細胞での α -TTP 遺伝子発現 (濃度依存的)

22(R)Hydroxy Cholesterol の添加濃度を変化させて、 α -TTP 遺伝子発現を検討する。

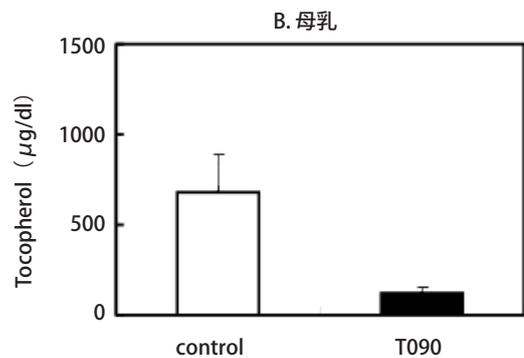
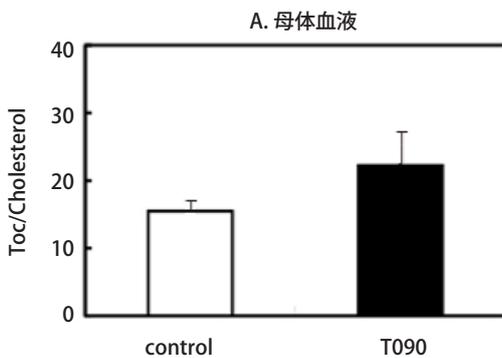


図 3 LXR リガンド投与 (T0901317) によるビタミン E 濃度

考 察

核内受容体は、標的遺伝子群のプロモーター領域に直接結合し、その遺伝子発現を制御するリガンド依存性の転写因子である。ステロイドホルモン（副腎皮質ステロイド、男性ホルモン、女性ホルモンなど）、脂溶性ビタミン（レチノイン酸、ビタミンD、ビタミンK）、脂溶性生理活性物質などをリガンドとする。LXRの主な作用はコレステロール代謝および脂質合成である⁶⁾。そのリガンドはコレステロールの代謝物であるオキシステロールであり、主な標的遺伝子群は、ABCA1、脂肪酸合成酵素、リポプロテインリパーゼ、SREBP-1c、アポリポプロテインE、Cyp7a酵素などである。すなわち、肝細胞ではコレステロールの代謝あるいは胆汁酸への排泄、マクロファージおよび小腸では、コレステロールの排出を調節している。

今回の結果では、乳腺細胞において、 α -TTP遺伝子は発現していた。 α -TTP遺伝子が乳腺細胞に発現していることから、この遺伝子は母乳中のビタミンE濃度調節に関与している可能性がある。さらには、乳腺細胞中の α -TTP遺伝子発現は、核内受容体LXRにより上昇した。すなわち、 α -TTP遺伝子発現は、脂質代謝に関連する転写因子により調節されたことから、その遺伝子発現は、脂質代謝により影響を受けることが考えられる。

授乳期の雌ラットにLXRリガンドを投与することで、母乳中のビタミンE濃度が変化した。上記の結果をあわせて考えると、LXRは、血液および肝臓のみでなく乳腺・母乳中の脂質代謝に影響を与える可能性がある。またビタミンEは、強力な抗酸化作用を有することで知られている。LXRが母乳中のビタミンE濃度調節に

関与することで、LXRは乳児の酸化ストレス防御機構に重要な役割を果たしているかもしれない。乳腺細胞における核内受容体の役割については、今後の研究が期待される。

要 約

本研究では、乳腺細胞における脂溶性物質（特にビタミンE）の変動を検討した。

乳腺組織培養細胞において、ビタミンEの同族体である α -トコフェロールの輸送タンパク質 α -TTP遺伝子は発現していた。さらに α -TTP遺伝子発現は、脂質代謝に関連する核内受容体LXRのリガンドにより上昇した。また、母体へのLXRリガンドにより、母乳中の α -トコフェロール濃度が変化した。以上から、脂質代謝に関連する核内受容体群は、乳腺組織の遺伝子発現および母乳の脂質代謝に影響を与える可能性が示唆された。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、財団法人三島海雲記念財団による学術奨励金を賜りましたことを深謝いたします。

文 献

- 1) 新井洋由：ビタミン，**72**，353-361，1998.
- 2) 平原文子：ビタミンEと臨床（平井俊策編），pp33-47，医薬ジャーナル社，2005.
- 3) Ouahchi K, et al.: Nat Genet., **9**, 141-145, 1995.
- 4) Gotoda T, et al.: N Engl J Med., **333**, 1313-1318, 1995.
- 5) Yokota T, et al.: Ann Neurol., **41**, 826-832, 1997.
- 6) Zelcer N, Tontonoz P: J Clin Invest., **116**, 607-14, 2006.