



准教授  
小林 謙

#### 経歴

2005年 北海道大学農学研究科博士課程修了  
2005年 福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科学講座  
博士研究員  
2006年 慶應義塾大学医学部 薬理学教室 助教  
2010年 北海道大学大学院農学研究院  
酪農食品科学研究室 助教  
2015年 北海道大学大学院農学研究院  
細胞組織生物学研究室 准教授

## 甘味と旨味が乳腺上皮細胞の母乳分泌を調節する機構の解明

### 1. 背景・目的

「おいしさ」とは一般的に舌や口で感じる甘味、酸味、塩味、苦味、うま味のバランスのことを示す。また、第6の味として脂肪味も新たに見出されている。広義で捉えると、「おいしさ」とは味覚のみならず、香り、見た目、食べごたえ、飲食の際に生じる音など、5感の総合情報で決定するものとも言える。一緒に食べる人、食卓の雰囲気などによっても「おいしさ」は変化する。しかし、「おいしさ」を決定する要素はそれだけだろうか。

俗説であるが、体に不足している食べ物はおいしく感じると言われている。近年、この俗説を裏付ける研究成果が続々と報告されている。それは、甘味、酸味、塩味、苦味、うま味、脂肪味を感知する受容体が体内の様々な細胞に発現していたことである。例えば、すい臓β細胞は甘味受容体の T1R3 を発現し、この受容体に人工甘味料が結合するとインシュリン分泌が促進される[1]。また、小腸杯細胞には苦味受容体・TAS2R131 が発現し、有害物質への応答に関わる[2]。他にも腎臓や皮膚など、「おいしさ」とは無縁そうな器官の細胞にも味覚受容体が発現し、生理的な役割を担っていることが明らかになりつつある。

泌乳期の乳腺上皮細胞は、血液中のグルコースやアミノ酸を側底部細胞膜に局在する輸送体などを介して細胞内へ取り込み、これらを材料として乳糖や乳タンパク質を合成し、体外側に面した頭頂部側細胞膜から細胞外に分泌する細胞である。私たちは先行研究において、マウスの乳腺上皮細胞に甘味受容体 (T1R3/T1R3) と旨味受容体 (T1R2/T1R3) が発現していることを見出した (未発表データ)。しかし、これらの受容体が泌乳期の乳産生においてどのような役割を果たしているか、現時点でほとんどわかっていない。

乳児に母乳の「おいしさ」を提供する母乳育児には、乳幼児の死亡率を低下させ、糖尿病やアトピー性皮膚炎などの発症率を低下させる効果がある[3]。乳腺上皮細胞は甘味とうま味を感じる能力を有している。そこで本研究では、乳腺上皮細胞が甘味と旨味の「おいしさ」の存在下において、どのように母乳産生を行っているかを解明する。

## 2. 方法

### 2.1. ヒト乳腺上皮細胞の培養

本研究ではヒト乳腺上皮細胞を用いて乳分泌培養モデルを作製した。まず、購入したヒト乳腺上皮細胞を増殖培地（5%キレートウシ胎児血清、10 ng/mL hEGF、5 ng/mL hFGF、200 nM デキサメタゾン、1% ITS-X、1 µg/mL エピネフリン、1 ng/mL コレラトキシン、10 µM Y27632、0.07 mM 塩化カルシウムを含むカルシウムフリーDMEM/F12）を用いて10倍程度に増殖させ、凍結保存した。解凍後、24 well plate用のcell culture insertに $6 \times 10^4$ 個となるように乳腺上皮細胞を播種し、3日間培養した。続いて、乳分泌誘導培地（2.5%ウシ胎児血清、4 ng/mL hEGF、1 ng/mL hFGF、1 µM デキサメタゾン、1% ITS-X、1 µg/mL エピネフリン、1 ng/mL コレラトキシン、0.1% ウシ脳下垂体抽出液、100 ng/mL prolactinを含むDMEM/F12）に交換し、さらに5日間培養した。また、T1R3阻害剤（lactisole）、甘味受容体を活性化する非糖質系甘味料（sucralose）、甘味受容体のポジティブアロステリック修飾因子（グアニル酸：GMP、イノシン酸：IMP）の最終濃度がそれぞれ5 mM、0.5 mg/mL、2.5 mMとなるようにcell culture insertの上層と下層の培地に添加し、1時間もしくは3日間培養した後、細胞層と培地を回収した。

### 2.2. 免疫染色

cell culture insert上で培養した乳腺上皮細胞を $-20^{\circ}\text{C}$ に冷却したメタノールに10分間、続いて1%ホルムアルデヒドを含むPBSに $4^{\circ}\text{C}$ で10分間浸漬し、固定した。T-PBSで洗浄後、0.2% TritonX-100を含むPBSに10分間浸漬した。牛血清アルブミンを5%含むT-PBSでブロッキング処理を施した後、一次抗体溶液に浸漬し、 $4^{\circ}\text{C}$ で2日間静置した。T-PBSで洗浄した後、蛍光標識した二次抗体溶液と室温で45分間反応させた。染色した細胞は共焦点レーザー顕微鏡（TCS SF5、LEICA）を用いて観察および撮影を行った。

### 2.3. ウェスタンブロッティング

マウス乳腺上皮細胞の培養終了後、培地と細胞層をウェスタンブロッティング用のサンプルとして供試した。SDS-PAGEは7.2%もしくは12%アクリルアミドゲルを用いて行い、タンク式ブロッティング装置（Bio-Rad）を使用してタンパク質をPVDF膜へ転写させた。そのPVDF膜を4%スキムミルクに浸し、室温で1時間振盪した。続いて一次抗体溶液に浸漬し、 $4^{\circ}\text{C}$ で2日間静置した。T-PBSで洗浄後、HRP標識した二次抗体溶液と室温で45分間反

応させた。T-PBS 洗浄後、ルミネートフォルテ HRP Substrate (Merck) と ChemiDoc™ XRS+ システム (Bio-Rad) を用いてバンドを検出した。得られたバンドの解析には Image Lab (Bio-Rad) の解析ツールを使用し、細胞内 $\beta$ -アクチン量を内因性コントロールとした。

## 2.4. 経上皮電気抵抗値の測定

経上皮電気抵抗値の測定は、セルカルチャーインサートで培養した乳腺上皮細胞と Millicel-EPS system (Millipore) を用いて行った。セルカルチャーインサートの内層と外層の培地に電極を挿入し、抵抗値を測定した。ブランクとして乳腺上皮細胞を播種していないセルカルチャーインサートの抵抗値を測定した。

## 2.5. 統計処理

数値データは平均値、エラーバーは標準誤差を示す。統計分析は Tukey の方法を用いて行い、 $p < 0.05$  の場合に有意差があると判定した。

## 3. 結果および考察

### 3.1. ヒト乳腺上皮細胞を用いた乳分泌培養モデル

乳腺上皮細胞は側底部細胞膜側から乳成分合成に必要な栄養成分を吸収し、反対側の頭頂部側細胞膜から乳成分を分泌する。このような細胞極性を培養下で再現するため、ヒト乳腺上皮細胞を cell culture insert 上に播種し、隙間なく並んだ細胞層と密着結合の形成を誘導し、上槽と下層の培地を区切る培養モデルを作製した (図 1A-C)。この培養モデ

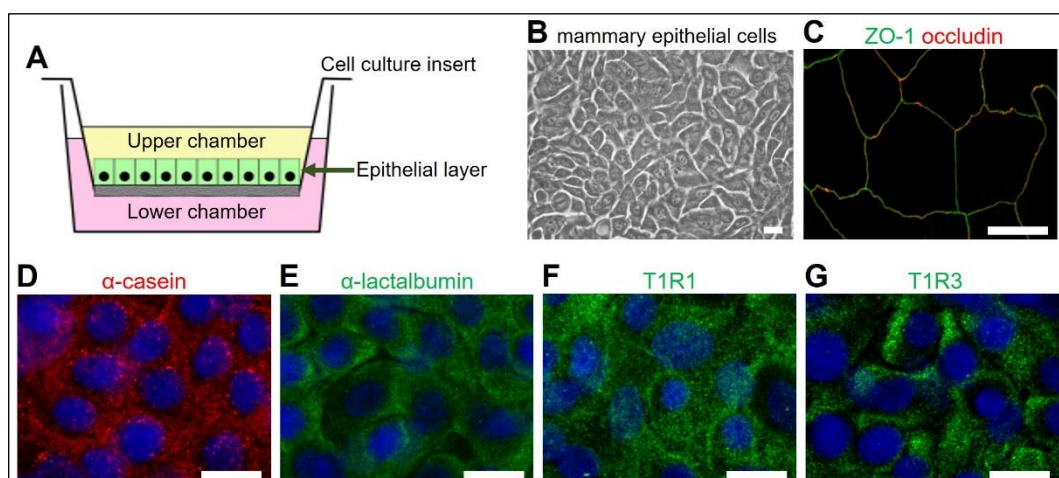


図1 ヒト乳腺上皮細胞を用いた乳分泌培養モデル

ヒト乳腺上皮細胞をCell culture insert上でコンフルエントまで培養した後、分化誘導培地で5日間して乳分泌を誘導した。乳分泌培養モデルの模式図 (A)、Cell culture insert上の乳腺上皮細胞層の位相差顕微鏡像 (B)、密着結合マーカーであるZO-1 (C, 緑) とoccludin (C, 赤)、 $\alpha$ -casein (D, 赤)、 $\alpha$ -lactalbumin (E, 緑)、T1R1 (F, 緑)、T1R3 (G, 緑) の免疫染色像を示す。青はDAPI染色した細胞核を示す。Bar = 20  $\mu$ m

ルにおいて乳腺上皮細胞は乳タンパク質の  $\alpha$ -casein と  $\alpha$ -lactalbumin を発現していた (図 1D, E)。また、乳腺上皮細胞は旨味受容体のサブユニットである T1R1 (図 1F)、甘味受容体と旨味受容体のサブタイプである T1R3 も発現していた (図 1G)。以上の結果より、この培養モデルは本研究に適していると判断し、以降の実験に供試した。

### 3.2. 甘味受容体と旨味受容体の活性化と阻害が乳産生と密着結合に及ぼす影響

甘味成分であるグルコースと旨味成分であるグルタミン酸は細胞の正常な代謝に必要な培地成分である。そこで本実験では、グルコースとグルタミン酸存在下で甘味受容体と旨味受容体を阻害するため lactisole、甘味受容体を強く活性化する非糖質系甘味料の sucralose[4]、および旨味受容体のグルタミン酸応答をさらに増強させる IMP と GMP[5]、これらの存在下で乳腺上皮細胞を3日間培養し、乳腺上皮細胞の乳産生と密着結合構成タンパク質に及ぼす影響を調べた。

カゼインの一種である  $\alpha$ -casein の細胞内発現レベルはいずれの処理群でも同レベルであったが、上槽培地中の  $\alpha$ -casein レベルは lactisole 処理群と GMP/IMP 処理群においてコントロールよりも上昇していた (図 2A, B)。一方、細胞内と培地中のラクトフェリンはいずれの処理群においても同レベルであった (図 2C)。続いて、乳腺上皮細胞の密着結合を構成する claudin-3、-4、occludin の発現レベルを調べると、lactisole 処理群と

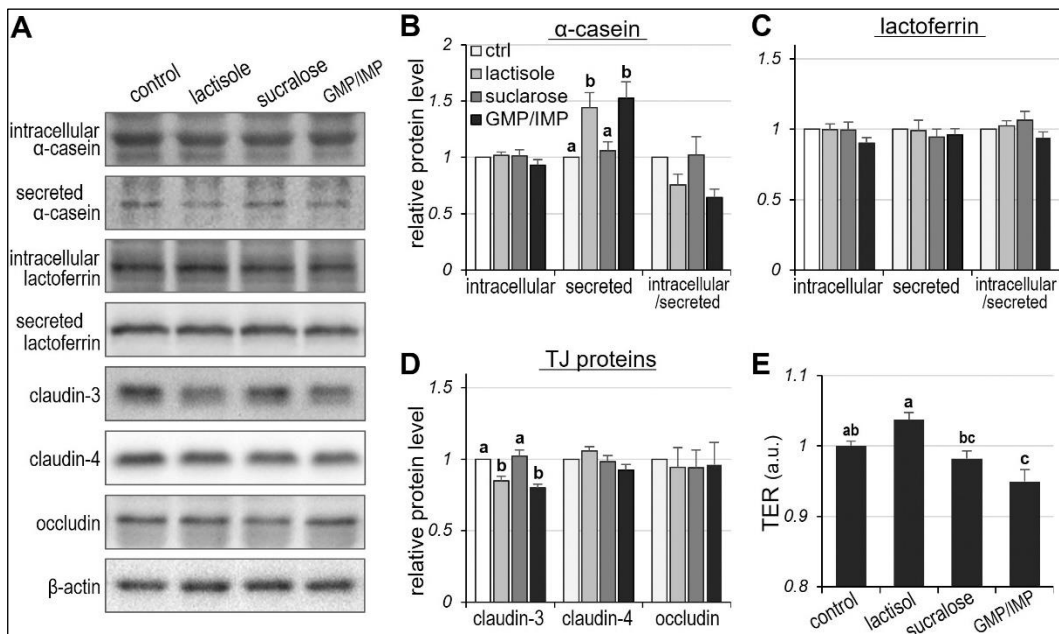


図2 甘味と旨味が乳タンパク質産生とタイトジャンクションに及ぼす影響

ヒト乳腺上皮細胞を5 mM lactisole (T1R3阻害剤)、0.5 mg/mL sucralose (甘味受容体活性化成分)、2.5 mM GMPと2.5 mM IMP (旨味受容体活性化成分)を含む分化培地で3日間培養した。ウェスタンブロットティング像 (A) とそのバンドのデンシトメトリー解析のグラフ (B-D) を示す。

(E) 乳腺上皮細胞層の経上皮電気抵抗値 (TER) を示す。異符号間に有意差 ( $p < 0.05$ )、error bar: 標準偏差

GMP/IMP 処理群において claudin-3 の発現レベルが低下していた (図 2D)。claudin-3 は分娩後に乳腺上皮細胞の密着結合領域に集約し、強固なバリアを形成することが知られている。そこで経上皮電気抵抗値を測定し、乳腺上皮細胞層の密着結合のバリア機能を調べた。その結果、予想に反して lactisole 処理群のバリア機能は低下しておらず、GMP/IMP 処理群においてのみバリア機能が低下していた (図 2E)。以上の結果より、T1R3 サブユニットの阻害と旨味の増強が泌乳期の乳腺上皮細胞に作用し、カゼイン分泌と密着結合に影響を及ぼすことが示唆された。

### 3.3. 甘味受容体と旨味受容体の活性化と阻害がシグナル経路に及ぼす影響

乳腺上皮細胞の乳産生を上方調節する転写調節因子として、STAT5 と mTOR が知られている。また、mTOR は Akt と ERK とともに細胞の増殖性や生存性の調節にも関与する。本実験ではこれらのシグナル分子の活性化状態を評価するため、各分子のリン酸化体 (p) と総タンパク質 (t) の発現レベル、および総タンパク質に対するリン酸化体の比率を調べた。STAT5、mTOR、ERK のリン酸化体と総タンパク質の発現レベル、およびリン酸化比率の平均値は各処理によって変動していたが、いずれも有意差は認められなかった (図 3A-C, E)。一方、Akt のリン酸化レベルは GMP/IMP 処理群において lactisole 処理群よりも低下していた (図 3D)。また、lactisole 処理群の総 Akt 発現レベルはコントロールと sucralose

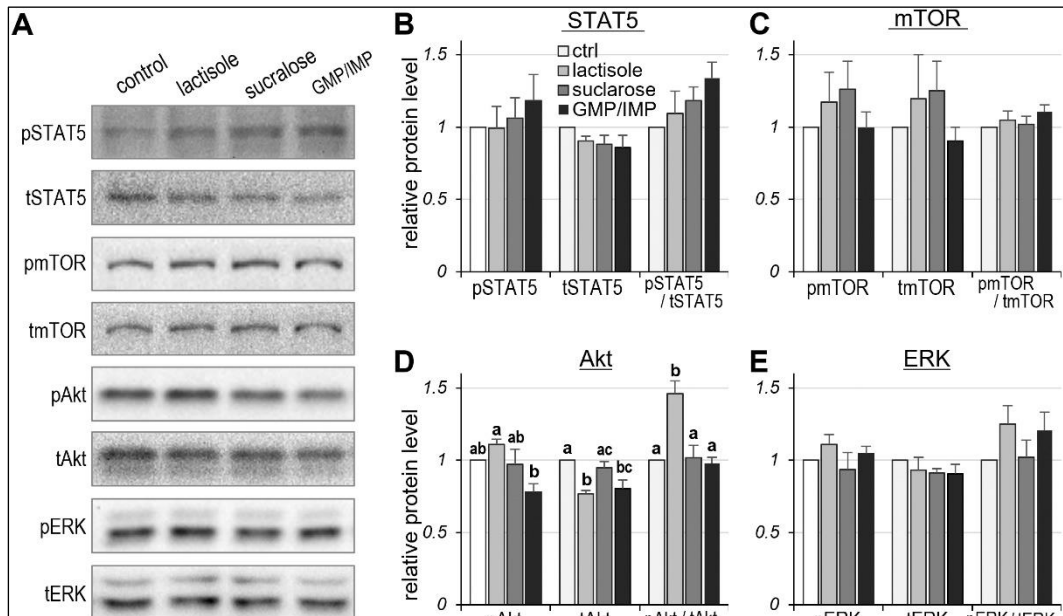


図 3 甘味と旨味がヒト乳腺上皮細胞の細胞内シグナル経路に及ぼす影響

ヒト乳腺上皮細胞を5 mM lactisole (T1R3阻害剤)、0.5 mg/mL sucralose (甘味受容体活性化成分)、2.5 mM GMPと2.5 mM IMP (旨味受容体活性化成分)を含む分化培地で2日間培養した。ウェスタンブロッティング像 (A) とそのバンドのデンストメトリー解析のグラフ (B-E) を示す。異符号間に有意差 ( $p < 0.05$ )、error bar: 標準偏差

処理群よりも低下し、Akt のリン酸化比率は他の処理群よりも有意に高かった。Akt は細胞の増殖性、生存性、タンパク質合成などに関与する。また、lactisole は甘味受容体と旨味受容体を阻害し、GMP/IMP は旨味受容体の細胞内シグナルを増強する。以上より、旨味受容体は Akt 経路を介して乳腺上皮細胞の生存性や代謝を調節していることが示唆された。

### 3. 4. 甘味受容体と旨味受容体の短期的な活性化と阻害がシグナル経路に及ぼす影響

これまでの結果から、甘味受容体と旨味受容体の阻害剤と活性化成分は乳腺上皮細胞の乳産生や密着結合に影響していることが示唆された。乳腺上皮細胞の乳産生能力やバリア機能は、3 種類の MAPK シグナル経路 (p38、JNK、ERK) が短期的に活性化し、調節していることが知られている。そこで甘味受容体と旨味受容体の阻害剤と活性化成分の処理一時間後において、これらのシグナル経路の活性化レベルが変化しているかを調べた。

その結果、lactisole 処理した乳腺上皮細胞において p38 のリン酸化レベルが上昇し、ERK のリン酸化レベルは低下していた (図 4A, B, D)。一方、sucralose は JNK のリン酸化比率を低下させた (図 4C)。また、3 日処理において lactisole や GMP/IMP の影響を受けていた Akt についても調べると、lactisole 処理 1 時間後には Akt のリン酸化が誘導されていることがわかった (図 4E)。以上より、乳腺上皮細胞の甘味受容体と旨味受容体は、MAPK シグナル経路や Akt 経路を介して乳腺上皮細胞の性状を調節していると考えられる。

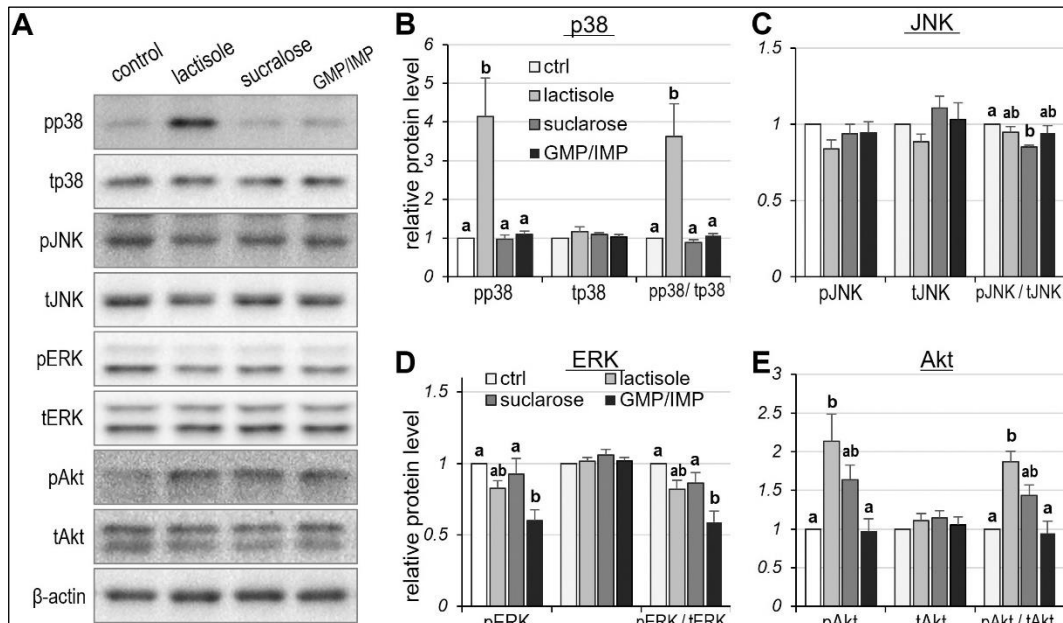


図 4 甘味と旨味のがヒト乳腺上皮細胞の細胞内シグナル経路に及ぼす短期的な影響

ヒト乳腺上皮細胞を 5 mM lactisole (T1R3阻害剤)、0.5 mg/ml. sucralose (甘味受容体活性化成分)、2.5 mM GMPと 2.5 mM IMP (旨味受容体活性化成分) を含む分化培地で 2 日間培養した。ウェスタンブロットティング像 (A) とそのバンドのデンストメトリー解析のグラフ (B-E) を示す。異符号間に有意差 ( $p < 0.05$ )、error bar: 標準偏差

#### 4. まとめ

本研究の結果、ヒト乳腺上皮細胞における甘味受容体と旨味受容体の活性化や阻害が、乳腺上皮細胞の乳産生能力、密着結合、および細胞内シグナル経路の一部に作用することが示された。生体内において、乳腺上皮細胞の周囲には甘味成分であるグルコースや乳糖、旨味成分であるグルタミン酸やイノシン酸が存在している。そのため、乳腺上皮細胞は甘味や旨味などの「おいしさ」を感知し、泌乳期の乳産生を行っている可能性がある。また、旨味受容体として mGluR1 および mGluR4 も知られている。今後、これらの阻害剤を用いた実験により、旨味と乳腺上皮細胞の関係性がさらに理解できることが期待される。

#### 5. 謝辞

本研究の実施において、ご支援を賜りました公益財団法人サッポロ生物科学振興財団に深く感謝いたします。

#### 引用文献

1. Kojima I, Medina J, Nakagawa Y. Role of the glucose-sensing receptor in insulin secretion. *Diabetes Obes Metab.* 2017;19 Suppl 1:54-62.
2. Prandi S, Bromke M, Hubner S, Voigt A, Boehm U, Meyerhof W et al. A subset of mouse colonic goblet cells expresses the bitter taste receptor Tas2r131. *PLoS One.* 2013;8(12):e82820.
3. Victora CG, Rollins NC, Murch S, Krasevec J, Bahl R. Breastfeeding in the 21st century - Authors' reply. *Lancet.* 2016;387(10033):2089-90.
4. Zhang F, Klebansky B, Fine RM, Liu H, Xu H, Servant G et al. Molecular mechanism of the sweet taste enhancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(10):4752-7.
5. Nelson G, Chandrashekar J, Hoon MA, Feng L, Zhao G, Ryba NJ et al. An amino-acid taste receptor. *Nature.* 2002;416(6877):199-202.