厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業）
日本人の食事摂取基準（栄養所要量）の策定に関する基礎的研究
平成 16 年度～18 年度　総合研究報告書

主任研究者　柴田　克己

Ⅰ．総合研究報告

16. 母乳分泌における脂溶性ビタミンの細胞内輸送機構の解析

分担研究者　　玉井　浩　　大阪医科大学小児科　教授

要旨
乳腺細胞における脂質の分泌は、細胞内の lipid droplet に組み込まれて、milk fat globule として細胞外に分泌される。そこに至るまでのビタミン E の細胞内転送機構は不明であった。乳腺細胞においても α-TTP 遺伝子発現が確認されたことから、ビタミン E の転送機構は肝臓と同様のメカニズムが考えられる。

１　研究目的

母乳は子供の急速な成長と発達にとって重要であり、十分なエネルギーと必須栄養素を供給する。感染予防物質・細胞・ホルモン・酵素・成長因子・結合タンパク質など多くの物質を含んでいる。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。

成熟母乳中の脂質および脂溶性ビタミン濃度の構成と濃度はさまざまである。特に脂溶性ビタミン濃度は母親の摂取量の影響を受ける。しかし大多数は高値を呈することが多い。例外として母乳中のビタミンK濃度は低値であるため、新生児出血性疾患予防のために、出生後にビタミンKが投与される。

ビタミンEは抗酸化作用をもつ脂溶性ビタミンである。生体内で活性を有するビタミンEは、主にα-トコフェロールである。α-トコフェロールはホメオスタシスの維持に重要な役割を有する。脂溶性ビタミンであるビタミンEについては、肝細胞内におけるα-トコフェロール輸送タンパク質（α-TTP: α-tocopherol transfer prtein）が同定され、細胞内輸送機構が明らかにされている。α-TTPの役割として、血中のα-トコフェロール濃度を一定に保つことが考えられる。

母乳中のビタミンE濃度は母体の摂取量にもよるが、ほぼ充足されている。すなわち乳腺細胞においては、ビタミンEを積極的に細胞外に輸送する機構の存在が考えられる。近年、母乳分泌のメカニズムは詳細に解明されつつあり、乳腺細胞における母乳構成物質の細胞内輸送についてもいまだ検討中の段階である。しかし乳腺細胞においてはまだ検討されていない。今回我々は、乳腺細胞におけるビタミンE輸送機構について明らかにする。

２　これまでの研究経過

α-TTPは、東京大学薬学部新井洋由教授らにより報告された。α-TTPタンパク質は、主に肝臓、小脳、子宮に局在しており、細胞内でのα-トコフェロールの移動に関係している。α-TTP遺伝子は、脊髄小脳失調症を伴う家族性ビタミンE欠乏症の原因遺伝子であることが判明した。またα-TTP遺伝子欠損マウスでは、雌は不妊となる。申請者らは彼らとの共同研究で、α-TTP遺伝子について以下の結果が得られた。

１）妊娠初期の子宮内皮細胞に発現し、妊娠初期に必要である(Biol Reprod; 2002)。

２）胎盤の栄養膜にも発現し、妊娠の維持に必須である(Placenta; 2003)。

さらに我々は以下のことを明らかにした。

３）酸化ストレスあるいは血液中ビタミンE濃度により調節される

(Free Radic Res; 1998、Free Radic　Res; 2002)。

４）白血球においても発現が認められ、抗酸化に関係する可能性がある(Free Radic Res; 2003)。

次にビタミンEの輸送が積極的に必要と思われる乳腺細胞においてもα-TTP遺伝子が存在するか否かを検討した。その結果、乳腺細胞(MCF-7およびMCF-10培養細胞)においてα-TTP mRNAをPCR法にて確認し

た。

３　方法

ヒト培養細胞である Ishikawa cell（子宮内膜腺癌）、FLC-5（肝癌）、MCF-10（乳腺線維嚢胞）を用いて、添加実験を行った。添加リガンドとして、成長因子・ホルモン・ビタミン・脂溶性リガンドを用いた。添加 24 時間後の培養細胞から RNA を抽出し、real-time RT PCR 法を用いて、α-TTP 遺伝子発現を検討した。

４　結果

１）各培養細胞における α-TTP 遺伝子発現の確認（図１）

RT-PCR 法にて α-TTP 遺伝子発現を確認した。

２）リガンド添加実験（図２）

各培養細胞において、リガンド添加を行った結果、22(R) hydroxycholesterol (22R HC) 添加後、α-TTP 遺伝子発現が有意に上昇した(p<0.05)。

３）各培養細胞における LXR 遺伝子発現の確認（図３）

４）ヒト初代肝臓培養細胞における 22R HC 添加実験（図４）

ヒト初代培養細胞でも α-TTP 遺伝子発現が有意に上昇した(p<0.05)。

５）濃度依存実験（図５）

α-TTP 遺伝子発現の上昇は濃度依存的であった。

５　考察

乳腺細胞における脂質の分泌は、細胞内の lipid droplet に組み込まれて、milk fat globule として細胞外に分泌される。そこに至るまでのビタミン E の細胞内転送機構は不明であった。乳腺細胞においても α-TTP 遺伝子発現が確認されたことから、ビタミン E の転送機構は肝臓と同様のメカニズムが考えられる。

LXR はコレステロール代謝を制御する転写因子であり、肝臓においてコレステロール異化作用を有する CPY　7 a 遺伝子発現を亢進し、また末梢細胞や小腸においてコレステロールのトランスポーターである ABCA　1 遺伝子発現を誘導する。以上の結果から、α-TTP 遺伝子発現は LXR を介したコレステロール代謝機構の中で調節されている可能性が示唆された（図６）。

今後 α-TTP 遺伝子のプロモーター領域を取得し、転写活性実験を行い、転写レベルにおける発現調節を解析する予定である。また哺乳ラットの乳腺組織において α-TTP 遺伝子発現を確認する。

ビタミン E は乳児にとって重要な抗酸化物質である。今後、乳腺細胞におけるビタミン E の輸送機構が解明されることにより、母乳を介した酸化ストレスに対する防御機構が明らかになると思われる。

６　発表論文

1) Okamoto N, Murata T, Tamai H, Tanaka H, Nagai H.

Effects of alpha tocopherol and probucol supplements on allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness in a mouse model of allergic asthma.
Int Arch Allergy Immunol. 2006;141(2):172-80.
2) Takitani K, Zhu CL, Inoue A, Tamai H.
Molecular cloning of the rat beta-carotene 15,15'-monooxygenase gene and its regulation by retinoic acid.
Eur J Nutr. 2006 Sep;45(6):320-6.
3) Yoshikawa S, Morinobu T, Hamamura K, Hirahara F, Iwamoto T, Tamai H.
The effect of gamma-tocopherol administration on alpha-tocopherol levels and metabolism in humans.
Eur J Clin Nutr. 2005 Aug;59(8):900-5.
4) Hiroi M, Ogihara T, Hirano K, Hasegawa M, Morinobu T, Tamai H, Niki E.
Regulation of apoptosis by glutathione redox state in PC12 cells exposed simultaneously to iron and ascorbic acid.
Free Radic Biol Med. 2005 Apr 15;38(8):1057-72.
5) Inoue A, Muranaka S, Fujita H, Kanno T, Tamai H, Utsumi K.
Molecular mechanism of diclofenac-induced apoptosis of promyelocytic leukemia: dependency on reactive oxygen species, Akt, Bid, cytochrome and caspase pathway.
Free Radic Biol Med. 2004 Oct 15;37(8):1290-9
6) Takitani K, Inoue A, Koh M, Kawakami C, Kuno T, Kawamura N, Miyake M, Tamai H.
Pharmacokinetics of low-dose all-trans retinoic acid in Japanese children with cancer.
J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 2004 Jun;50(3):219-21.
7) Nakakura H, Ashida A, Hirano K, Tamai H.
Oxidative stress in a rat model of nephrosis can be quantified by electron spin resonance.
Pediatr Nephrol. 2004 Mar;19(3):266-70.

図1

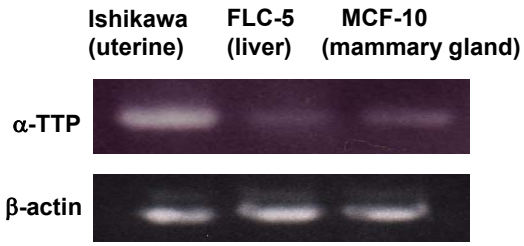

Ishikawa
(uterine)
FLC-5
(liver)
MCF-10
(mammary gland)
α-TTP
β-actin

図2

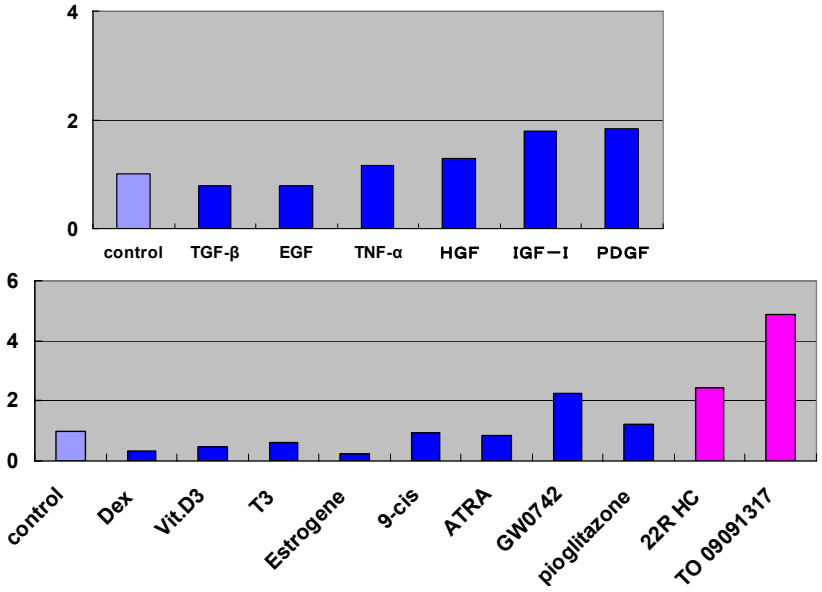

4
2
0
control
TGF-β
EGF
TNF-α
HGF
IGF−I
PDGF
6
4
2
0
control
Dex
Vit.D3
T3
Estrogene
9-cis
ATRA
GW0742
pioglitazone
22R HC
TO 09091317

図3

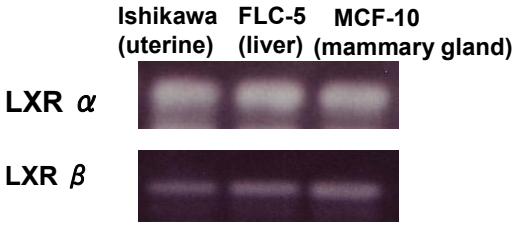

Ishikawa (uterine)
FLC-5 (liver)
MCF-10 (mammary gland)
LXR α
LXR β

図4

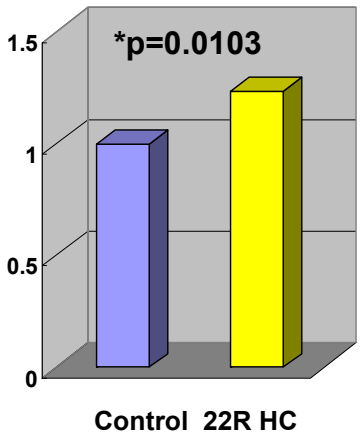

*p=0.0103
1.5
1
0.5
0
Control
22R HC

図５

MCF-10細胞

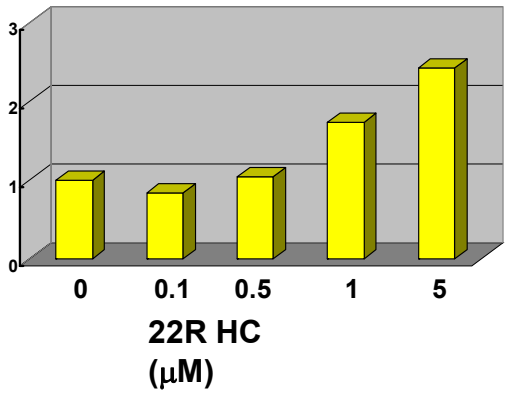
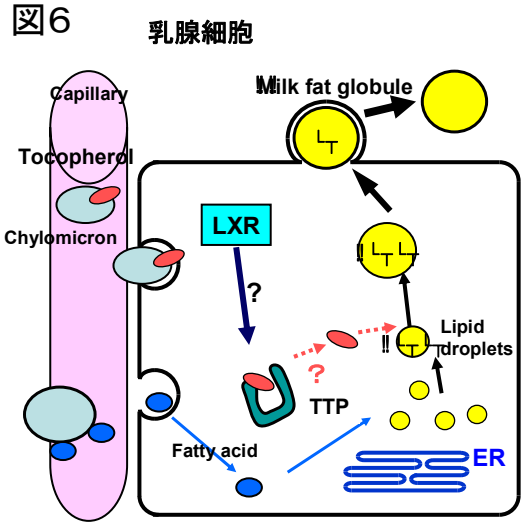


図6


乳腺細胞
Capillary
Tocopherol
Chylomicron
Milk fat globule
LXR
?
?
TTP
Lipid
droplets
Fatty acid
ER