

氏 名 中 野 春 男

学位（専攻分野） 博士(学術)

学 位 記 番 号 総研大甲第342号

学位授与の日付 平成10年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 Characterization of Myoepithelial Cells in  
Mammary Gland : Intracellular Ca<sup>2+</sup> Signalling  
and ATP Receptors

論 文 審 査 委 員 主 査 教 授 岡 田 泰 伸  
教 授 井 本 敬 二  
教 授 小 幡 邦 彦  
教 授 山 岸 俊 一  
教 授 宮 崎 俊 一 (東京女子医科大学)

## 論文内容の要旨

Mammary myoepithelial cells in mouse lactating glands were isolated and cultured to characterize the intracellular calcium ( $\text{Ca}_i^{2+}$ ) signalling leading to contraction. The  $\text{Ca}_i^{2+}$  was measured using the ratio of fura-2 fluorescence ( $F_{340}/F_{360}$ ) with an image analysis system, and the contraction was simultaneously monitored by the changes of fluorescence intensity ( $F_{360}$ ).

The first step of this study was to establish an isolation method of myoepithelial cells from the mammary gland. The new isolation method consisted of (1) the removal of connective tissue around the alveoli by the Dispase-collagenase method, (2) the dissociation of myo- and secretory epithelial cells from the alveoli by pipetting in 0.02% EDTA phosphate-buffered saline (PBS), and (3) the isolation of myoepithelial cells by Percoll density gradient centrifugation. Isolated myoepithelial cells were clearly distinguished from secretory epithelial cells by morphological and physiological characteristics.

Cultured myoepithelial cells assumed irregular spindle shapes and contracted well in response to oxytocin. F-actin stained with NBD-phalloidin was observed in dense bundles along the longitudinal axis in the cytoplasm. At the ultrastructural level, abundant bundles of microfilaments were prominent in the cytoplasm. In myoepithelial cells thin and thick filaments existed but not arranged in regular arrays in contrast to skeletal and cardiac muscles. Caveolae, the invagination of plasma membrane, were arranged in rows parallel to bundles of microfilaments, and associated with smooth endoplasmic reticulum. The immunofluorescence pattern of caveolin-1, a principal component protein of caveolae, was found to correspond to caveolae. Thus, using the new method he could isolate and culture myoepithelial cells that responded to oxytocin. Cultured myoepithelial cells showed well organized contractile features like smooth muscle cells.

Oxytocin ( $\geq 0.1$  nM) induced an increase in  $\text{Ca}_i^{2+}$  ( $F_{340}/F_{360}$ ) and contraction monitored by  $F_{360}$  in the central region of the cells. The increase in  $\text{Ca}_i^{2+}$  was transient even in the presence of oxytocin, while contraction followed the increase in  $\text{Ca}_i^{2+}$  and was persistent. The oxytocin-induced  $\text{Ca}_i^{2+}$  increase in the  $\text{Ca}^{2+}$ -free solution (0.5 mM EGTA) was nearly identical to that in normal Ringer's solution. The result suggests that oxytocin increases  $\text{Ca}_i^{2+}$  by releasing  $\text{Ca}^{2+}$  from intracellular stores and thereby induces contraction. The following results are consistent with intracellular stores being the primary source of  $\text{Ca}^{2+}$  for oxytocin-induced  $\text{Ca}_i^{2+}$  increase: (1) Nifedipine (10  $\mu\text{M}$ ) did not affect the oxytocin-induced increase in  $\text{Ca}_i^{2+}$ , and (2) oxytocin did not induce the increase in  $\text{Ca}_i^{2+}$  after an application of thapsigargin (1  $\mu\text{M}$ ), an inhibitor of endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. Caffeine (1 or 10 mM), an activator of  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release (CICR), did not induce the change in  $\text{Ca}_i^{2+}$ , and ryanodine (10  $\mu\text{M}$ ) did not affect the oxytocin-induced increase in  $\text{Ca}_i^{2+}$ . These results suggest

that CICR is not involved in myoepithelial contraction.

Various substances were examined whether they induce the  $\text{Ca}_i^{2+}$  increase and contraction in myoepithelial cells. Bradykinin ( $\geq 10$  nM), acetylcholine ( $\geq 10$   $\mu$ M), arg-vasopressin ( $\geq 1$  nM) and ATP ( $\geq 10$   $\mu$ M) induced the increase in  $\text{Ca}_i^{2+}$  and contraction, while noradrenaline (100  $\mu$ M), histamine (100  $\mu$ M), endothelin-1 (100 nM), endothelin-3 (10 nM), substance P (100 nM) and angiotensin-II (10  $\mu$ M) did not have any effects on  $\text{Ca}_i^{2+}$ . The  $\text{Ca}_i^{2+}$  responses to bradykinin, acetylcholine, arg-vasopressin and ATP were not affected in the  $\text{Ca}^{2+}$ -free solution. These results indicate that some neuroactive and vasoactive substances act on myoepithelial cells and induce the increase in  $\text{Ca}_i^{2+}$  by releasing  $\text{Ca}^{2+}$  from intracellular stores.

He investigated effects of nucleotides on myoepithelial cells in more detail, because extracellular nucleotides released from mechanically stimulated secretory epithelial cells are known to play a key role in propagating the intercellular  $\text{Ca}^{2+}$  wave in these cells. ATP induced an increase in  $\text{Ca}_i^{2+}$  and contraction in about 80% of myoepithelial cells. The  $\text{Ca}_i^{2+}$  response to ATP was not affected by  $\text{Ca}^{2+}$  removal but was suppressed by suramin (100  $\mu$ M), an antagonist of ATP receptors. The order of potency of nucleotides to increase  $\text{Ca}_i^{2+}$  was ATP = ADP > UTP > UDP. These results suggest that ATP receptors in myoepithelial cells may be of the  $\text{P}_{2Y}$  type.

Application of ATP (1  $\mu$ M) plus oxytocin ( $\leq 100$  pM) induced the increase in  $\text{Ca}_i^{2+}$  and contraction, although each of the stimulants did not have any effect on  $\text{Ca}_i^{2+}$  at the doses. The result suggests that ATP may ensure myoepithelial cell contraction induced by oxytocin at physiological concentrations (about 50 pM).

In the lactating mammary gland, secretory epithelial cells suffer dual mechanical stress from the pressure of milk accumulated in the alveoli during milk secretion and the contraction of myoepithelial cells upon milk ejection. Mechanically stressed secretory epithelial cells may provide extracellular nucleotides to myoepithelial cells and allow to initiate and potentiate oxytocin-induced milk ejection. Thus, in addition to the hormonal action of oxytocin, extracellular ATP may work as a paracrine mediator to enhance or regulate the milk ejection process.

## 論文の審査結果の要旨

申請者、中野春男氏は、乳腺筋上皮細胞に興味を持ち、その細胞の性質について研究を進めた。これまで、筋上皮細胞はオキシトシンに反応して収縮することにより腺胞内に溜まったミルクを導管に排出する機能を持つことが報告されているが、細胞レベルの基本的性質はこれまで殆ど明らかにされていなかった。この理由の第一は、本細胞の単離培養法が困難であったことにある。そこで彼は、乳腺筋上皮細胞の単離培養法の確立にまず取り組み、それを成功させた上で本細胞の収縮に至るカルシウムシグナリングについて fura-2 蛍光測光法により調べることを試みた。その研究の主な結果は次の通りである。

ディスペーゼとコラゲナーゼを用いて乳腺の分泌上皮細胞と筋上皮細胞を結合組織から分離懸濁させ、これをパーコール密度勾配法にかけることによって筋上皮細胞のみに単離し、これを培養系に移すことに世界で初めて成功した。形態学的観察では、培養筋上皮細胞において細胞内に横紋様構造を持たない密なアクチンフィラメントの存在と、滑面小胞体が近接して多数のカベオレ構造が認められた。これらのことから、筋上皮細胞は平滑筋様の構造を有していることが示された。

筋上皮細胞は、オキシトシン刺激に対して細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の増加で応答し、続いて収縮反応を示した。両反応は外液の  $Ca^{2+}$  に依存せず、 $Ca^{2+}$  チャンネル拮抗薬 nifedipine によっても影響されなかった。また、thapsigargin によって細胞内の  $Ca^{2+}$  ストアを枯渇させるとオキシトシンによる反応は見られなくなった。これらの結果から彼は、オキシトシンが主に細胞内ストアからの  $Ca^{2+}$  遊離をもたらすことによって、収縮を引き起こすと結論した。

筋上皮細胞の約 8 割は、細胞外 ATP 刺激によっても細胞内  $Ca^{2+}$  濃度増加と収縮で応答した。この反応は細胞内ストアからの  $Ca^{2+}$  遊離によって起こり、ATP 受容体の拮抗薬 suramin で抑制された。各種ヌクレオチドの効力が  $ATP = ADP > UTP > UDP$  の序列を示すことから、 $P_{2Y}$  型の ATP 受容体との関与が推定された。また、それぞれ単独では  $Ca^{2+}$  反応を起こさない濃度の ATP とオキシトシンを合わせて投与すると、相乗的效果として  $Ca^{2+}$  反応が見られた。機械的刺激を受けた分泌上皮細胞はヌクレオチドを放出することが知られている。これらの知見から、彼は腺胞内に溜まったミルクの圧力や筋上皮細胞の収縮という機械的刺激によって分泌上皮細胞から ATP が放出され、それが筋上皮細胞にパラクライン的に作用し、オキシトシンによる乳排出の開始と促進を引き起こすことを想定した。

この研究は、申請者独自の工夫により新しい筋上皮細胞の単離培養法を確立したこと、そしてこの細胞の収縮が細胞内ストアからの  $Ca^{2+}$  遊離に大きく依存した特徴を持つことを明らかにしたことのみならず、これまでオキシトシンによってのみで説明されてきた乳排出の過程に ATP が生理的役割を持つ可能性を新たに提起した点でも、大変優れたものとして評価できる。

申請者の論文は新しい重要な知見を提供するものとなっており、成果の一部は既に英文原著論文として発表されており、学位論文として充分ふさわしい内容であると審査委員会で一致して判定した。

また、審査委員会において提出論文の発表をさせた後に、その内容のみならず、その学問的背景や関連分野の研究動向についての口頭試問を行ったが、いずれに対する応答も的確であった。本論文は英文で書かれており、またその内容の多くが既に英文学術専門誌に

掲載されており、英語力にも何ら問題がないものと判断された。

以上、総合的に判断し、学位を取得するに足る水準に十分達しているものと判定した。