

# 乳腺における機械刺激と ATP 放出

古家喜四夫<sup>1)</sup>, 秋田 久美<sup>1)</sup>, 曾我部正博<sup>1, 2)</sup>

**要約:** ATP は普遍的な細胞外情報伝達物質として認識されつつあるが, その放出には機械的な刺激が関与する場合が多く, メカノシグナリングにおいて重要な役割を担っていると考えられる. 授乳期の乳腺では分泌上皮の袋である腺胞のまわりを筋上皮が取り囲んでおり, オキシトシンによって収縮することで射乳が起こる. この系での生理的な機械刺激としては, [1] オキシトシンによる筋上皮の収縮, [2] ミルクによる腺胞の膨張等が考えられる. [1] に関しては, 分泌上皮と筋上皮細胞の共培養系を作成しオキシトシンによって筋上皮細胞を収縮させたとき, 分泌上皮細胞から ATP が放出され  $\text{Ca}^{2+}$  波が伝播すること; [2] に関しては, 薄いシリコンゴム膜上に細胞を培養し伸展刺激を与えたとき, ATP の放出と  $\text{Ca}^{2+}$  の上昇が刺激強度依存的に起こること, によってそれぞれ ATP 放出の機械刺激となることを示した. 放出された ATP は分泌上皮細胞の P2Y2 型 ATP 受容体および筋上皮細胞の P2Y1 にオートクライン/パラクライン作用しミルクの分泌を制御していると考えられる. とくに, 筋上皮細胞の P2Y1 の活性化はオキシトシン受容体を協調的に増強し, オキシトシンに対する感受性を 1 桁上げることから, ミルクの満たされた腺胞のみが血中濃度のオキシトシンによって収縮できるという機構の存在を示唆した. ATP 放出経路に関しては機械刺激による一過性の放出以外に自発性の持続的放出があり, それは細胞外  $\text{Ca}^{2+}$ -free 溶液中で増強した. Luciferin-Luciferase 反応を用いた放出 ATP の定量, 薬理学的処理などの結果, 少なくとも 2 種以上の ATP 放出経路の存在が示唆された. 細胞外 ATP シグナリングにおける ATP 放出経路はいわば細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  シグナリングにおける  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルに相当し, その経路, 制御機構は多彩であると考

えられる.

## 1. はじめに

現在, ATP をはじめとするヌクレオチドは細胞外情報伝達物質としてその普遍性, 重要性が認識されつつある. ATP の放出はしばしば機械的な刺激によって起こり, メカノシグナリングにおける 1 つのキーポイントでもある. 例えば血管内皮細胞は血液の流れによるシェアーストレスによって ATP を放出し内皮細胞の機械応答性を増強している(1). 腎臓の上皮細胞は腎臓が尿で満たされたことによる膨張で機械刺激を受け ATP を放出し, 神経終末の P2X イオンチャネル型 ATP 受容体を活性化し痛みとして情報を脳に伝達する(2). 気道の有毛上皮細胞は異物による機械刺激によって ATP を放出し周りの細胞に  $\text{Ca}^{2+}$  波を伝播し粘液の排出を促進する(3). その他, 骨細胞, 表皮細胞, シュワン細胞など数多くの系においても機械刺激の情報変換に ATP 放出とそれに続く ATP 受容体の活性化が生理機能に直結している. 本稿において, 機械的刺激に対して非常に敏感な乳腺細胞(4)を具体例として ATP の放出によるメカノシグナリング機序をみていきたいと思う.

## 2. 機械刺激による ATP 放出と細胞間 $\text{Ca}^{2+}$ 波の伝播

微小電極の先を火で丸くした細いガラス管で細胞を軽く触ると (Touch 刺激) 触られた細胞で  $\text{Ca}^{2+}$  上昇が起こり, その  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルが周りの細胞に伝わっていくといういわゆる細胞間  $\text{Ca}^{2+}$  波が多種多様な細胞系においてみられる. この  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルの伝播は, 細胞間のギャップ結合を介して  $\text{IP}_3$  が伝わることによるとの報告もあったが(5), ギャップ結合の存在ではなくコネキシンの発現が重要であることがわかり(6, 7), 現在, 細胞外への ATP をはじめとするヌクレオチドの放出と周りの細胞での ATP 受容体の活性化が主要な経路であると考えられている.

培養乳腺上皮細胞の場合この  $\text{Ca}^{2+}$  波の伝播速度は約 10  $\mu\text{m/s}$  で数 100  $\mu\text{m}$  伝わって消える(8).  $\text{Ca}^{2+}$  波は離れたコロニーにも伝播し, 水流下では流れに沿って広がること,

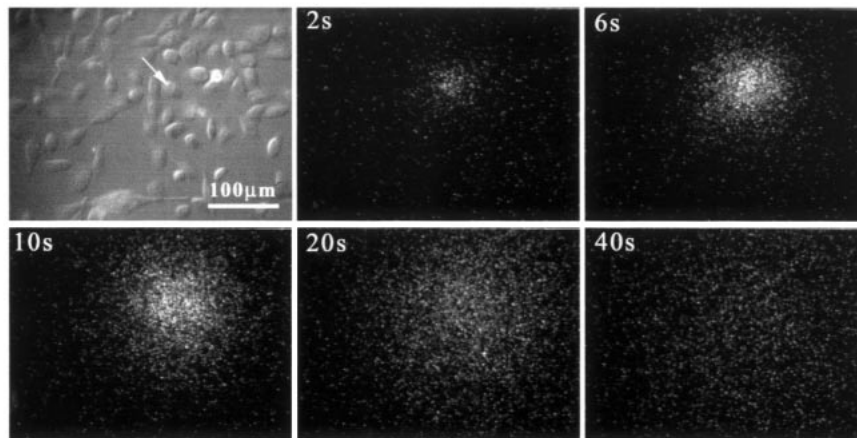
キーワード: ATP 放出, 乳腺, メカノシグナリング,  $\text{Ca}^{2+}$  波, P2Y

<sup>1)</sup> 科学技術振興機構・国際共同研究・細胞力覚プロジェクト

<sup>2)</sup> 名古屋大学大学院・医学研究科・細胞生物物理学

(〒466-8550 名古屋市昭和区鶴舞 65)

原稿受領日: 2004 年 3 月 8 日, 編集委員会依頼総説



**Fig. 1** Touch induced ATP-release observed by a real-time luminescence imaging system. Mechanical (touch) stimulation was applied to a cultured cell (arrow in the top left frame) of a normal human mammary epithelial cell line (hTERT-HME1). ATP luminescence by the Luciferin-Luciferase reaction was detected with 200-ms interval, using a high sensitivity cooled CCD camera with an image intensifier.

そして ATP 受容体の阻害薬のスラミンや ATP 分解酵素によって阻害されることなどから ATP の放出と拡散によっていることは十分に推測される(9). 私たちは実際に ATP が放出されていることを Luciferin-Luciferase 反応を用いた放出 ATP のリアルタイムイメージングによって確認することができた (Fig. 1). ATP の拡散の様子は, 細胞内での  $\text{Ca}^{2+}$  反応の遅延時間を考慮すると,  $\text{Ca}^{2+}$  波の伝播の様子とよく一致していた.

乳腺上皮細胞の場合この  $\text{Ca}^{2+}$  波の伝播に寄与する ATP 受容体は代謝調節型 (P2Y) の一つのサブタイプである P2Y2 である(10). この受容体が活性化されると G タンパク, PLC,  $\text{IP}_3$ ,  $\text{IP}_3$  受容体を介して ER からの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  反応が起きる. P2Y2 は骨芽細胞(11)や膵島細胞(12)でも  $\text{Ca}^{2+}$  波の伝播を担っている. またアストロサイトでは P2Y1 と P2Y2(13), 小腸絨毛下線維芽細胞では P2Y1(14)の寄与が報告されている.

このように  $\text{Ca}^{2+}$  波は ATP によって運ばれた細胞間情報が ATP 受容体を介して  $\text{Ca}^{2+}$  上昇という細胞内情報に変換された結果ということができる. では次にガラス棒でタッチするといった人工的な刺激ではない, 生体内で起こりえる機械刺激とは何かを考えてみたい.

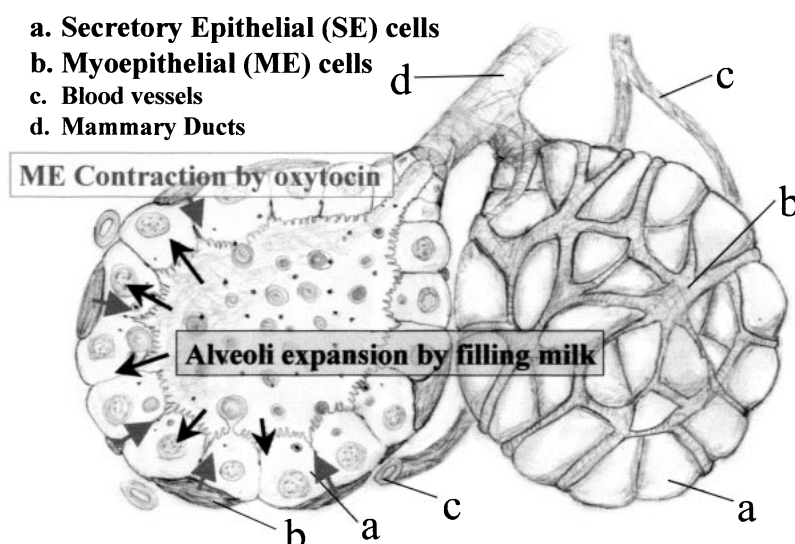
### 3. 乳腺における機械刺激

授乳期の乳腺では脂肪組織の中を無数に枝分かれした導管が発達し, その先端には腺胞と呼ばれる袋状の構造がぶどうの房状に形成される. 腺胞はミルクを合成分泌する分

泌上皮細胞でできた袋であり, 周りを筋上皮細胞によってかごのように取り囲まれている (Fig. 2). 合成分泌されたミルクはその中に蓄えられている. 乳児が母親の乳首を吸うとその刺激が視床下部へ伝わり脳下垂体後葉からオキシトシンが分泌される. 筋上皮はこのオキシトシンによって収縮し腺胞内のミルクが導管を経て乳首から放出され, 乳児はミルクを得ることが出来る. これが射乳反射と呼ばれるものである.

ではこのような乳腺組織において細胞が受ける機械刺激とは何であろうか. 2つの生理的な機序が考えられる (Fig. 2). [1] オキシトシンによる筋上皮細胞の収縮は腺胞を大きく変形させ, その時, 分泌上皮細胞は機械的刺激を受けると考えられる. [2] また授乳期間中絶えず合成分泌され腺胞に蓄積していくミルクが腺胞の袋を押し広げ, その時, 分泌上皮細胞は伸展機械刺激を受けると想像される.

[1] については分泌上皮細胞と筋上皮細胞の混合培養系を開発し検証した(4,15,16). この混合培養系にオキシトシンを作用させると, 筋上皮細胞の収縮に引き続き分泌上皮細胞上を伝播する  $\text{Ca}^{2+}$  波が発生し, それはスラミンによって抑制された. このことは筋上皮細胞の収縮が分泌上皮細胞への機械刺激となって ATP が放出されたことを示している. さらに興味深いことに, 筋上皮細胞は P2Y1 型の ATP 受容体を持っており, 発生した  $\text{Ca}^{2+}$  波によって再び収縮することを見いだした. オキシトシン受容体と P2Y1 どちらも G タンパク共役型で  $\text{IP}_3$  上昇による  $\text{Ca}^{2+}$  増加を介して筋上皮細胞の収縮を引き起こす. そのため ATP



**Fig. 2** Schematic drawing of the alveoli of lactating mammary gland and two plausible sources of mechanical stimuli in vivo. [ 1 ] Myoepithelial ( ME ) cell contraction in response to oxytocin and [ 2 ] alveoli expansion by filling milk both cause mechanical stress to the secretory epithelial ( SE ) cells.

はオキシトシンの反応を協調的に増強することが可能となる(17). すなわち ATP は腺胞での筋上皮の収縮をポジティブフィードバック的に増強していると考えられる.

次に別の生理的な機械刺激である [ 2 ] 腺胞の膨張について検討した結果をみてみよう.

#### 4. 伸展刺激による $\text{Ca}^{2+}$ 上昇と ATP 放出

腺胞の膨張はその袋を構成する上皮細胞にとっては細胞が伸展することを意味する. そこでシリコンゴム (PDMS 樹脂) で出来た薄膜の底を持つチェンバーを作り, 乳腺上皮細胞をその上に培養し, 伸展装置を用いて伸展刺激 (Stretch 刺激) を与えた. その時, 細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  変化を  $\text{Ca}^{2+}$  蛍光指示薬を用いて測定し, 同時に灌流液を 1 分ごとに集め Luciferin-Luciferase による発光反応をルミノメーターで測定し放出 ATP の定量を行った (Fig. 3).

その結果, 乳腺上皮細胞は伸展刺激に応答し細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇を引き起こした (Fig. 3A). この  $\text{Ca}^{2+}$  反応は伸展の大きさとともに増大したが, 外液  $\text{Ca}^{2+}$  に依存せず細胞内ストアーからの遊離であることが示された. また同時に灌流液中の ATP 量も刺激の強さとともに増大しており (Fig. 3B), 伸展刺激によって ATP が確かに放出されていることが示された.

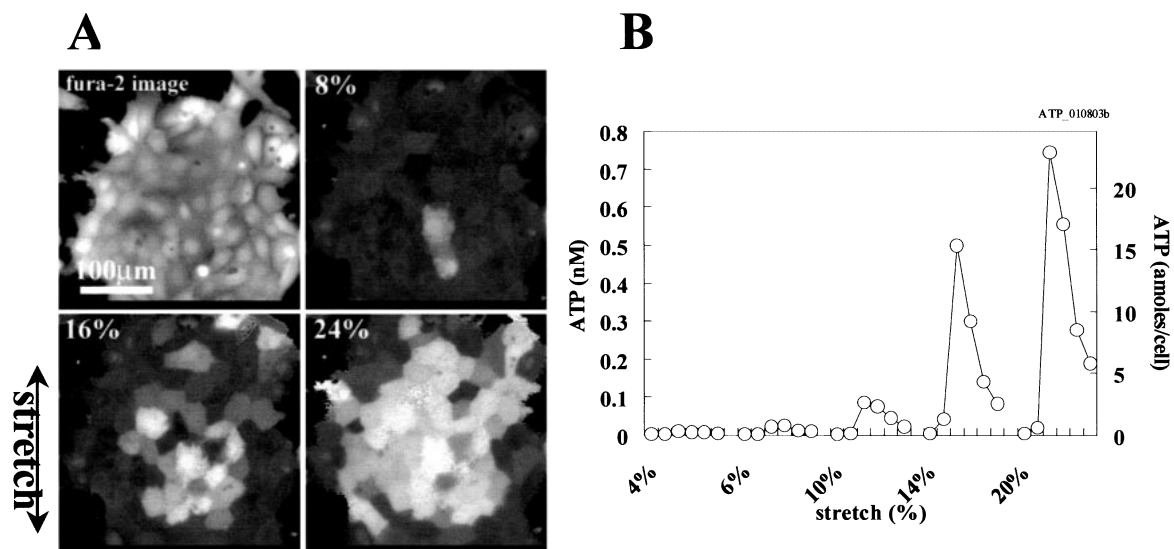
以上のことから乳腺上皮細胞は伸展機械刺激にも応答し  $\text{Ca}^{2+}$  上昇と ATP の放出を引き起こすことが明らかとなっ

た. このことは腺胞の膨張が乳腺における機械刺激として働きうることを示す. この機構は次に示すように大きな生理的な意味を持っている.

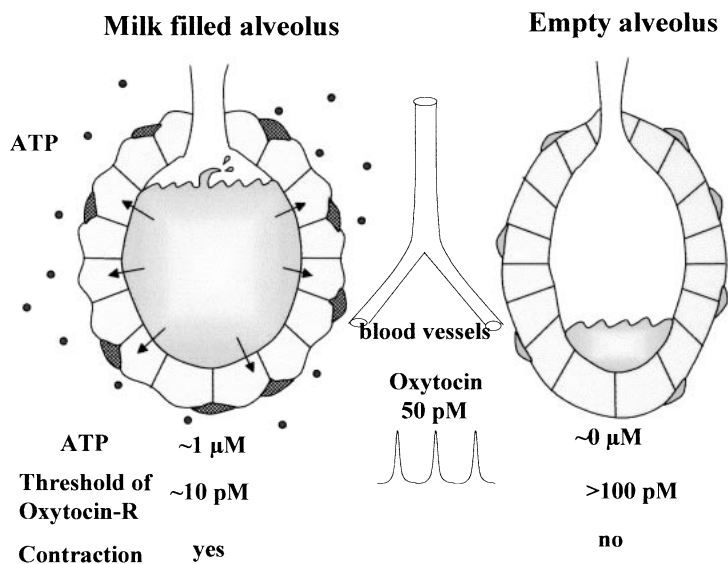
#### 5. 伸展刺激に応答することの生理的意義 (Fig. 4)

授乳期の腺胞ではミルクは絶えず合成, 分泌され腺胞内に蓄えられ, オキシトシンによって筋上皮が収縮し, 中のミルクが放出される. オキシトシンは脳下垂体後葉からパルス状に内分泌され, そのピークの濃度は 50 pM 程度といわれている(18). 一方筋上皮細胞を単離してその性質をみるとオキシトシンに対する反応の閾値は 100 pM を超えている. しかし前にも述べたように筋上皮細胞は P2Y1 を持っており ATP にも反応する. その閾値以下の濃度である 1  $\mu\text{M}$  の ATP を存在させるとオキシトシンに対する感受性は協調的に増強し, 閾値が 1 桁下がって 10 pM 程度となる(17).

すなわちミルクが貯まった腺胞の周りには伸展刺激によって放出された ATP が存在し, その ATP は筋上皮に作用し, オキシトシンに対する感受性を, ミルクの貯まっていない腺胞に比べ, 1 桁上げることになる. このことによって, 血中からの同じ濃度のオキシトシンにさらされてもミルクの貯まった腺胞は収縮しミルクを放出するが, ミルクがまだ貯まっていない腺胞は収縮しないという機構が考えられる.



**Fig. 3** Stretch-induced intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  increase (A) and ATP-release (B) in mouse mammary epithelial cells in culture. A: Top left image is a fura-2 fluorescence image (F360). Cells were stretched in the vertical direction (shown by arrow) and relaxed to the original length after 3 s. Images (8%, 16%, and 24%) are fura-2 ratio images (F340/F360) just after the relaxation. Stretch % means percentage of stretch length / original length. B: Released ATP was measured by collecting the perfusate every 1 min after stretch using the Luciferin-Luciferase reaction.



**Fig. 4** A plausible role of stretch induced ATP release in mammary alveoli.

## 6. ATP 放出の機序

これまでに乳腺細胞において生理的な作用によって

ATP が放出されることを明らかにしてきたが、では ATP はどのような機序で放出されるのであろうか。ATP 放出の機序は普遍的な ATP 細胞外情報伝達系の情報発信源に

当たる重要なポイントであり、この特集の目的とするところでもある。ATP 放出の経路としては現在、細胞内ベシクルを経由した開口分泌 (19~22)、ある種の陰イオンチャネル (23~26) やギャップ結合の hemi-チャネル (27, 28)、各種トランスポーター (29~31) などいくつかの細胞で報告されている。しかしまだその詳細および ATP 放出機構の全体像は明らかではない。

乳腺上皮細胞では、主として Luciferin-Luciferase 反応を用いた ATP 放出量の定量により、以下の点が示唆された。ATP 放出は機械刺激による一過性の放出以外に自発性の放出がありそれは細胞外  $\text{Ca}^{2+}$ -free 溶液 (CFS) 灌流によって増大した。これらの放出量は少なく見積もって、自発性放出  $0.18 \text{ amole/cell} \cdot \text{min}$ , CFS による放出  $1.9 \text{ amole/cell} \cdot \text{min}$ , そして 1 回の伸展刺激による ATP 放出量は  $9.0 \text{ amole/cell} \cdot \text{stretch}$  であった。この量は 1 つの細胞の全 ATP 量の 1/1500 に相当する。薬理的には、機械的刺激による ATP 放出を特異的に抑制するものは見出せなかったが NPPB (ある種の  $\text{Cl}^-$  チャネルブロッカー) は自発性および CFS による放出は抑制した。また UTP によって誘導される ATP 放出も見られ、それは U73122 や Thapsigargin で抑制された。以上のことから、機械的刺激による ATP 放出経路はまだ明らかではないが、乳腺細胞における ATP 放出の経路としては 2 種以上の異なった経路が関与していることが示唆された。

## 7. まとめ

以上、筋上皮の収縮や腺胞の膨張といった生理的な作用が機械刺激となって ATP が放出されることを明らかにし、その放出された ATP が分泌上皮自身に作用するオートクラインや筋上皮に作用するパラクライン作用によって乳腺組織内において乳汁分泌をコントロールしているであろうことを述べてきた。このような ATP をはじめとするヌクレオチドの働きは乳腺だけではなく、ほとんどの臓器においてその寄与の大小はあっても存在していると考えられ、実際、そのような報告が急速に増加している。また、機械受容は細胞や生体のセンサーのなかでも唯一実体の解明されていないものであるが、ATP 放出は 1 つの機械刺激受容機序として考えることができ、その解明はメカノシグナリングにおける 1 つのキーポイントでもある。

普遍的な細胞内情報伝達系である細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  情報伝達系の研究においてその信号の発信源に当たる  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの研究は非常に重要であり、多彩な経路やその制御機構が明らかにされてきた。普遍的な ATP 細胞外情報伝達系において ATP 放出機序はそれに相当し、おそらく単純ではなく多くの種類の経路、制御機序が存在することは十分に想像される。それらを解明し ATP 情報伝達系の全体像

を明らかにしていきたいと考えている。

## 文 献

- 1) Yamamoto K, Korenaga R, Kamiya A, Ando J. P2X<sub>4</sub> receptors mediate ATP-induced calcium influx in human vascular endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279(1):H285-292.
- 2) Cockayne DA, Hamilton SG, Zhu QM, et al. Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X<sub>3</sub>-deficient mice. *Nature*. 2000;407(6807):1011-1015.
- 3) Homolya L, Steinberg TH, Boucher RC. Cell to cell communication in response to mechanical stress via bilateral release of ATP and UTP in polarized epithelia. *J Cell Biol*. 2000;150:1349-1359.
- 4) 古家喜四夫, 中野春男, 榎本浩一. ATP のオートクライン・パラクライン作用. *生体の科学*. 2001;52:138-144.
- 5) Charles AC, Naus CC, Zhu D, Kidder GM, Dirksen ER, Sanderson MJ. Intercellular calcium signaling via gap junctions in glioma cells. *J Cell Biol*. 1992;118(1):195-201.
- 6) Scemes E, Suadicani SO, Spray DC. Intercellular communication in spinal cord astrocytes: fine tuning between gap junctions and P2 nucleotide receptors in calcium wave propagation. *J Neurosci*. 2000;20(4):1435-1445.
- 7) Cotrina ML, Lin JH, Alves-Rodrigues A, et al. Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95(26):15735-15740.
- 8) Furuya K, Enomoto K, Yamagishi S. Spontaneous calcium oscillations and mechanically and chemically induced calcium responses in mammary epithelial cells. *Pflugers Arch*. 1993;422(4):295-304.
- 9) Enomoto K, Furuya K, Yamagishi S, Oka T, Maeno T. The increase in the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration induced by mechanical stimulation is propagated via release of pyrophosphorylated nucleotides in mammary epithelial cells. *Pflugers Arch*. 1994;427(5-6):533-542.
- 10) Enomoto K, Furuya K, Moore RC, Yamagishi S, Oka T, Maeno T. Expression cloning and signal transduction pathway of P2U receptor in mammary tumor cells. *Biol Signals*. 1996;5(1):9-21.
- 11) Jorgensen NR, Geist ST, Civitelli R, Steinberg TH. ATP- and gap junction-dependent intercellular calcium signaling in osteoblastic cells. *J Cell Biol*. 1997;139:497-506.
- 12) Cao D, Lin G, Westphale EM, Beyer EC, Steinberg TH. Mechanisms for the coordination of intercellular calcium signaling in insulin-secreting cells. *J Cell Sci*. 1997;110:497-504.
- 13) John GR, Scemes E, Suadicani SO, et al. IL-1 $\beta$  differentially regulates calcium wave propagation between primary human fetal astrocytes via pathways involving P2 receptors and gap junction channels. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96(20):11613-11618.
- 14) 古家園子, 古家喜四夫. ATP 放出による小腸絨毛上皮下線維芽細胞の細胞間コミュニケーションの制御. *電子顕微鏡*. 2003;38(S1):82.

- 15) Furuya K, Nakano H, Enomoto K. Cause and roles of mechanical stress in mammary gland. In: Okada Y, editor. Cell volume regulation. Amsterdam: Elsevier; 1998. p. 85-91.
- 16) Nakano H, Furuya K, Furuya S, Yamagishi S. Involvement of P2-puriner receptors in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  responses and the contraction of mammary myoepithelial cells. *Pflügers Arch.* 1997;435:1-8.
- 17) Nakano H, Furuya K, Yamagishi S. Synergistic effects of ATP on oxytocin-induced intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  response in mouse mammary myoepithelial cells. *Pflügers Arch.* 2001;442:57-63.
- 18) Higuchi T, Honda K, Fukuoka H, Negoro H, Wakabayashi K. Release of oxytocin during suckling and parturition in the rat. *J Endocrinol.* 1985; 105:339-346.
- 19) Osipchuk Y, Cahalan M. Cell-to-cell spread of calcium signals mediated by ATP receptors in mast cells. *Nature.* 1992;359:241-244.
- 20) Maroto R, Hamill OP, Brefeldin A block of integrin-dependent mechanosensitive ATP release from *Xenopus* oocytes reveals a novel mechanism of mechanotransduction. *J Biol Chem.* 2001;276:23867-23872.
- 21) Knight GE, Bodin P, De Groat WC, Burnstock G. ATP is released from guinea pig ureter epithelium on distension. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002; 283(2):F281-288.
- 22) Coco S, Calegari F, Pravettoni E, et al. Storage and release of ATP from astrocytes in culture. *J Biol Chem.* 2003;278(2):1354-1362.
- 23) Sabirov RZ, Dutta AK, Okada Y. Volume-dependent ATP-conductive large-conductance anion channel as a pathway for swelling-induced ATP release. *J Gen Physiol.* 2001;118(3):251-266.
- 24) Hisadome K, Koyama T, Kimura C, Droogmans G, Ito Y, Oike M. Volume-regulated anion channels serve as an auto/paracrine nucleotide release pathway in aortic endothelial cells. *J Gen Physiol.* 2002;119(6):511-520.
- 25) Aleu J, Martin-Satue M, Navarro P, et al. Release of ATP induced by hypertonic solutions in *Xenopus* oocytes. *J Physiol.* 2003;547(Pt 1):209-219.
- 26) Bell PD, Lapointe JY, Sabirov R, et al. Macula densa cell signaling involves ATP release through a maxi anion channel. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(7):4322-4327.
- 27) Cotrina ML, Lin JH, Lopez-Garcia JC, Naus CC, Nedergaard M. ATP-mediated glia signaling. *J Neurosci.* 2000;20(8):2835-44.
- 28) Stout CE, Costantin JL, Naus CC, Charles AC. Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J Biol Chem.* 2002;277(12):10482-10488.
- 29) Roman RM, Wang Y, Lidofsky SD, et al. Hepatocellular ATP-binding cassette protein expression enhances ATP release and autocrine regulation of cell volume. *J Biol Chem.* 1997;272(35):21970-21976.
- 30) Bodin P, Burnstock G. Purinergic signalling: ATP release. *Neurochem Res.* 2001;26(8-9):959-969.
- 31) Ito Y, Son M, Sato S, et al. ATP release triggered by activation of the  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channel in human airway calu-3 cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004;30(3):388-395.

**Abstract** - Extracellular ATP mediated mechano-signaling in mammary glands. Kishio FURUYA<sup>1)</sup>, Kumi AKITA<sup>1)</sup>, and Masahiro SOKABE<sup>1,2)</sup> (<sup>1</sup>ICORP Cell-Mechanosensing Project, JST, <sup>2</sup>Department of Physiology, Nagoya University, School of Medicine, Nagoya 466-8550, Japan )

*Folia Pharmacol. Jpn.* ( Nippon Yakurigaku Zasshi ) **123**, 397 ~ 402 ( 2004 )

ATP, an important and ubiquitous extracellular signaling molecule, is often released by mechanical stimuli and plays an essential role in mechano-signaling. In lactating mammary glands, secretory epithelial ( SE ) cells form alveoli in which milk is held, and myoepithelial ( ME ) cells surrounding the alveoli contract in response to oxytocin to expel milk. Previously we found that the contraction of ME cells worked as a mechanical stress to SE cells and caused ATP-release in cultured mammary epithelial cells. The released ATP activated P2Y2 in surrounding SE cells and P2Y1 in ME cells. We already reported that ATP synergistically enhanced oxytocin response in ME cells. These findings mean that ME and SE cells interact mutually via released ATP to enhance the milk ejection. Recently, we found that cell-stretch also induced  $\text{Ca}^{2+}$ -increases and ATP-release. The stretching of alveoli should occur by milk filling. So, only the milk-filled alveoli ( but not empty alveoli ) are surrounded by ATP. The ATP lowers the threshold of the oxytocin receptors and enables the milk-filled alveoli to contract in response to oxytocin at a concentration in the blood. Slight but apparent constitutive-ATP-release was observed in non-stimulated cells and the release was enhanced in  $\text{Ca}^{2+}$ -free solution. The pathway of ATP-release is not yet clear, but pharmacologically, there seems to be two or more pathways.

**Keywords:** ATP-release; mechano-signaling; mammary glands; calcium-wave; P2Y