

学 位 論 文 題 名

ウシ乳腺組織構築における脂肪細胞由来分泌因子の役割

学位論文内容の要旨

乳腺組織は、妊娠および泌乳、退縮の過程に伴って形態的にも機能的にも変化し、その過程を繰り返す臓器である。乳腺組織の発達は全身性のホルモンによって制御されているが、ホルモンは乳腺上皮細胞に直接作用するだけでなく、間質細胞にも作用して組織局所で成長因子などを産生することによって、乳腺上皮細胞の形態や機能を支持すると考えられる。

間質脂肪細胞は全身のエネルギー調節に肝要であるだけでなく、レプチンに代表される様々なサイトカインを分泌する内分泌細胞としても知られている。また、脂肪組織に乳腺上皮細胞を移植すると導管や乳汁分泌機能を有する腺房を形成することや、脂肪組織を欠くマウスの乳腺組織は正常に発達しないことが報告されている。このように、脂肪細胞は乳腺組織の発達に重要な役割を果たしていると考えられる。

多くの因子が乳腺組織の形態形成に関与することが今までに明らかにされている。このうち肝細胞増殖因子 HGF は間質細胞で産生、分泌され、上皮細胞などに発現している受容体 c-Met に作用する、多機能なサイトカインである。HGF は、乳腺上皮細胞に作用して導管様の構造物を形成することが知られている。しかし、HGF が脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインであるのか、ウシなどの反芻動物の乳腺組織においてどのような役割を果たすのか、など多くの点が不明であった。そこで本研究では、ウシ間質脂肪細胞における HGF mRNA の発現を、脂肪細胞の分化という観点から解析した。さらに、間質細胞から分泌された HGF の乳腺上皮細胞に対する形態形成作用と、これに対する泌乳ホルモンやレプチンの影響について検討した。

そこで、本学位論文の第一章ではまず、ウシ HGF およびその受容体 c-Met の cDNA をクローニングした。ウシ HGF および c-Met (遺伝子データベース登録番号 AB110822 および AB112434) はマウスやラットのコモログよりもヒトのそれに高い相同性を示した。ウシでは、HGF および c-Met mRNA の発現は脂肪組織や乳腺を含む様々な臓器で検出された。乳腺組織では、HGF mRNA は非妊娠期にのみ発現が検出され、発達期および泌乳期、退縮期には発現は認められなかった。c-Met mRNA は非妊娠期および退縮期に検出され、発達期や泌乳期には認められなかった。c-Met タンパク質は非妊娠期および発達期、退縮期において上皮細胞にその発現が認められ、泌乳期にはみられなかった。しかし、乳腺間質脂肪組織における HGF の発現を検出することはできなかった。

第二章では脂肪細胞における HGF の発現を *in vitro* で検討した。HGF mRNA は、ウシ脂肪細胞では、前駆脂肪細胞ではほとんど検出されなかったが、成熟脂肪細胞へと分化すると、有意に増大した。ヒト脂肪細胞でも HGF mRNA は同様に分化に伴って誘

導された。逆にマウスやラットの脂肪細胞では HGF mRNA は分化前に発現しており、分化後に消失した。ウシ脂肪細胞の HGF mRNA 発現量は、プロモーター活性や HGF mRNA の安定性に依存しなかったため、他の機構によって調節されると考えられた。一方、マウス脂肪細胞の HGF mRNA 発現量は HGF mRNA の安定性に影響されることが示唆された。

第三章では、間質脂肪細胞がウシ乳腺上皮細胞(BMEC)の形態形成に及ぼす作用を、コラーゲンゲル包埋三次元培養法によって *in vitro* で検討した。ウシの前駆脂肪細胞馴化培地(FCM)による BMEC の形態形成はみられなかったが、成熟脂肪細胞馴化培地(ACM)は BMEC の導管および腺房様構造物の形成を誘導した。対照的に、マウス 3T3-L1 細胞の FCM は BMEC の導管様構造物の形成を誘導したが、マウス ACM による BMEC の形態形成はみられなかった。リコンビナント HGF は BMEC の導管形成を誘導し、抗 HGF 中和抗体または HGF アンタゴニストである NK4 はウシ ACM またはマウス FCM による BMEC の形態形成を阻害した。ウシ ACM からは FCM よりも明らかに多くの HGF タンパク質が検出され、対照的に、マウス 3T3-L1 FCM 中には ACM よりも高濃度の HGF タンパク質が検出された。これらの結果は、脂肪細胞における HGF の発現パターンが動物種特異的であり、ウシでは成熟脂肪細胞、マウスでは前駆脂肪細胞から分泌される HGF が乳腺上皮細胞の形態形成を誘導することを示唆した。

さらに、第四章では、泌乳ホルモン(インスリン、コルチゾールおよびプロラクチン)と代表的な脂肪細胞分泌因子であるレプチンによる BMEC の形態形成への影響について調べた。HGF は単独で BMEC の形態形成を誘導し、その形態形成作用は泌乳ホルモンの存在下で相乗的に増強された。レプチンは、HGF 単独による BMEC の形態形成に対して抑制的にはたらくだけでなく、HGF と泌乳ホルモンの相乗作用をも抑制的に調節することがわかった。レプチンおよびその受容体 OB-Rb mRNA は非妊娠期および妊娠期、退縮期に発現が検出され、泌乳期には発現は認められなかった。以上の結果は、全身性のホルモンや組織局所で産生される HGF やレプチンなどの脂肪細胞由来分泌因子が、巧みに乳腺組織の形態形成を調節しうることを示した。

本研究により、ウシ HGF およびその受容体である c-Met の分子構造が明らかとなり、それらの発現の組織分布や、乳腺組織の発達過程における発現変化が明らかとなった。特にウシ HGF は間質の成熟脂肪細胞から分泌され、乳腺上皮細胞の形態形成に重要な因子であることが示された。また、同じく脂肪細胞から分泌されるレプチンが、HGF によって誘導されるウシ乳腺上皮細胞の形態形成を阻害し、これらの脂肪細胞由来分泌因子の多寡が乳腺上皮細胞の形態を巧みに制御することが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 木 村 和 弘

副 査 教 授 稲 葉 睦

副 査 教 授 昆 泰 寛

副 査 教 授 斉 藤 昌 之 (天使大学)

学 位 論 文 題 名

ウシ乳腺組織構築における脂肪細胞由来分泌因子の役割

乳腺組織の発達は全身性のホルモンによって制御されているが、ホルモンは乳腺上皮細胞に直接作用するだけでなく、間質細胞にも作用して細胞増殖因子などを産生させ、間接的に乳腺上皮細胞の形態や機能を支持する。これらの因子のうち、肝細胞増殖因子 HGF は間質細胞から分泌され、上皮細胞に発現する受容体 c-Met に作用し、上皮細胞による導管形成を促進させることが知られる。しかし、間質細胞における HGF の発現調節や他の細胞分泌因子との相互作用などについては明らかにされていない。本学位論文は、ウシ間質細胞における HGF の発現を、間質細胞の脂肪細胞分化という観点から調べ間質細胞分泌因子としての HGF がウシ乳腺上皮細胞 (BMEC) の形態形成に及ぼす作用について検討したものである。さらに、HGF の形態形成作用に対する脂肪細胞分泌因子レプチンの影響について検討した。

第一章では、まずウシ HGF およびその受容体 c-Met の cDNA をクローニングした (遺伝子データベース登録番号 AB110822 および AB112434)。それらは他の動物種の遺伝子の塩基配列と高い相同性を示し、各々に特徴的な分子構造を有すると推察された。また脂肪組織や乳腺を含む様々な臓器で HGF および c-Met 遺伝子の発現が検出されたが、乳腺組織におけるそれらの発現はいずれも乳腺の発達過程により大きく変化することが明らかとなった。

第二章では間質細胞における HGF の発現を検討した。脂肪細胞へ分化させる前のウシ間質細胞では HGF mRNA はほとんど検出されなかったが、脂肪細胞へ分化させるとその発現は有意に増大した。ヒト間質脂肪細胞でもウシ細胞と同様に分化に伴って HGF mRNA 発現が誘導された。しかし、マウスやラットの間質細胞では分化前において HGF mRNA が検出されたが、分化させると完全にその発現は消失した。このように間質細胞の HGF 遺伝子の発現には動物種差が存在した。この理由は不明であるが、ウシ間質細胞における HGF mRNA の発現はプロモーター活性やその安定性に依存せず、その他の機構によって調節されること、マウス間質細胞における発現は HGF mRNA の安定性に影響されることを示唆した。

第三章では、BMEC の形態形成に及ぼす間質細胞分泌因子の作用をコラーゲンゲル包埋三次元培養法によって検討した。ウシ前駆脂肪細胞馴化培地(FCM)は BMEC の形態に影響を与えなかったが、成熟脂肪細胞馴化培地(ACM)は導管および腺房様構造物を形成させた。対照的に、マウス 3T3-L1 細胞の FCM は導管様構造物を形成させ、マウス ACM は形態形成を誘導しなかった。ウシ ACM またはマウス FCM からは HGF タンパクが検出され、抗 HGF 中和抗体または HGF アンタゴニスト NK4 はウシ ACM またはマウス FCM による BMEC の形態形成を阻害した。つまり第二章で示した動物種特異的な HGF 遺伝子の発現に一致して、間質細胞から HGF が分泌され、それが乳腺上皮細胞の形態形成を調節していることを示した。

第四章では、泌乳ホルモン(インスリン、コルチゾルおよびプロラクチン)と代表的な脂肪細胞分泌因子であるレプチンの BMEC 形態形成に対する作用について調べた。いずれも単独では形態形成に作用を示さなかった。しかし、泌乳ホルモンは組換え HGF による BMEC の形態形成作用を相乗的に増強した。一方、レプチンは HGF による BMEC の形態形成を泌乳ホルモンの有無に関わらず阻害した。これらの結果は全身性のホルモンや組織局所で産生される HGF に加え、レプチンなどの間質細胞由来分泌因子が、巧妙に乳腺組織の形態形成を調節していることを示した。

以上のように本研究はウシ HGF およびその受容体である c-Met の分子構造を明らかにし、ウシ間質細胞における HGF の発現が脂肪細胞分化に伴い誘導され、分泌された HGF はウシ乳腺上皮細胞の形態形成因子として機能することを示した。また、同じく脂肪細胞から分泌されるレプチンが HGF による乳腺上皮細胞の形態形成を阻害したので、これらの脂肪細胞由来分泌因子の多寡が乳腺の組織形成を巧みに制御することが示唆された。つまり本研究はウシ乳腺組織における上皮-間質細胞間の相互作用の一端を明らかにしたものであり、獣医学の発展に大きく寄与するものである。よって、審査員一同は、上記博士論文提出者山地 大介氏の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規定第 6 条の規定による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。