

乳腺発達に及ぼす食餌性肥満の影響： 脂肪細胞分泌因子レプチンの役割

学位論文内容の要旨

乳腺は出生後に大きく形態と機能を変化させる特徴的な組織である。生後すぐの乳腺は乳頭部周辺にわずかな乳腺導管を持つのみであるが、性成熟までに導管は伸長と分枝を繰り返し、皮下脂肪組織全体に広がる。妊娠すると既存の導管から側方に導管側枝が出芽、伸長し、より密な分枝構造をとる。そして導管先端に腺房を発達させ、乳タンパク質や乳脂肪分を産生するようになり、「泌乳」という重要な機能を獲得する。過剰なエネルギーの摂取や食餌性肥満は、妊娠末期や泌乳期の乳腺の形態的また機能的な発達を抑制することが、ウシ、ヒト、マウス、ラットなど様々な動物で示されてきた。しかし、その肥満による乳腺発達の抑制機構は不明であった。

そこで、4週齢のマウスに高脂肪食(HFD)または通常食(ND)を給餌し、食餌性肥満マウスと対照マウスを作製した。そして両群の乳腺発達過程とその組織構造の変化を、妊娠前(Pre)、妊娠8、13、18日目(P8、P13、P18; それぞれ妊娠前期、中期、後期に相当する)と順に観察、比較し、肥満がいかにして乳腺発達を抑制するかを明らかにすることで、抑制機構の解明を試みた。

まず、妊娠前の導管発達に及ぼす食餌性肥満の影響を検討した。両群とも導管は皮下脂肪組織全体に広がっており、分枝数も同じであったが、HFD群では皮下脂肪組織の拡大に伴って導管を伸長させた。その結果、HFD群の乳腺導管は、ND群に比べ分枝頻度が低下した粗な形態を示した。またHFD群の導管外径はND群に比べて小さくなった。組織学的な解析を行ったところ、ND群の乳腺導管は管腔上皮細胞と筋上皮細胞の2層の上皮細胞層からなるのに対し、HFD群の乳腺導管は筋上皮細胞層が不完全であり、部分的に欠損していた。また管腔上皮細胞は欠損することなく導管内腔を覆っていたものの、細胞高の低下など、細胞形態に異常が生じた。乳腺間質は、導管のすぐ周囲を取り囲む膠原線維層や、その外側の脂肪細胞や血管などから構成される。HFD群の乳腺間質では中性脂肪の蓄積により脂肪細胞が肥大していたのに加え、導管周囲の膠原線維層が肥厚していた。以上のよう、食餌性肥満は妊娠前の導管組織構造に既に影響を与えていることが明らかになった。

乳腺組織構造の異常の要因として、脂肪細胞分泌因子レプチンの関与を検討した。レプチンの乳腺におけるmRNA発現と血漿中濃度は、肥満によって10倍以上に増加し、その受容体(Ob-R)は乳腺導管の上皮細胞や導管周囲の線維芽細胞に発現していた。レプチン発

現アデノウイルスをマウスに投与しおよそ1週間高レプチン血症を誘導すると、乳腺組織で1型コラーゲン前駆体の産生が増加し、脂肪組織由来の線維芽細胞をレプチンで刺激すると培養液中の1型コラーゲン量が増加した。よって、レプチンが乳腺間質の線維芽細胞に直接または間接的に作用して、導管周囲の線維化を引き起こす可能性が示された。また、ウシ乳腺上皮細胞をレプチンで刺激すると、その増殖が抑制された。つまり、肥満マウスの乳腺ではレプチンは乳腺上皮細胞にも作用し、上皮細胞の増殖を抑制して、管腔上皮細胞と筋上皮細胞の正常な二層構造を欠損させたと考えられた。

次に、妊娠後の乳腺発達に及ぼす食餌性肥満の影響を検討した。ND群に妊娠を誘導するとP8に導管から側方に導管側枝が出芽し、P13では導管側枝の伸長と共に、その先端に乳脂肪滴を持たない未熟な腺房構造が認められた。P18では腺房数が増加し、腺房はさらに大きく発達し、乳脂肪滴の蓄積と腺房内腔の拡大が観察された。一方、HFD群は、P8では導管側枝の出芽がわずかに認められるだけであり、P13には導管側枝は出芽してくるものの腺房構造はほとんど観察されなかった。P18においてもND群のP13と同程度の乳脂肪滴を持たない腺房構造が観察されるだけだった。組織学的な解析を行なったところHFD群の乳腺発達には遅れはあるものの、妊娠後生じてきた導管側枝や腺房における筋上皮細胞、膠原線維の局在パターンはND群と同じであった。次に、乳腺機能として乳タンパク質の一つであるwhey acidic protein(WAP)のmRNA発現を定量した。ND群、HFD群ともP13から明瞭に認められP18でさらに発現量が増大した。しかし、いずれの時点でもND群に比べてHFD群で発現量は低かった。つまり、食餌性肥満は妊娠期の始めに腺房の基部をなす導管側枝の出芽を抑制し、後に続く腺房の形態的および機能的発達を遅延させることが明らかになった。

妊娠初期に起こる導管側枝の出芽には、導管周囲を取り巻く膠原線維の分解と乳腺上皮細胞の増殖が必要である。よって、妊娠前に生じていた導管周囲の線維化が導管側枝の出芽を抑制したと考えられた。また妊娠期においても脂肪細胞分泌因子レプチンの血中濃度は肥満マウスで顕著に高値を示した。さらにOb-Rは腺房上皮細胞にはほとんど発現が認められなかったが、妊娠前から存在する導管や、導管側枝の乳腺上皮細胞には発現していた。よって、レプチンの乳腺上皮細胞増殖抑制作用が導管側枝の出芽や伸長の抑制を引き起こしたとも考えられた。また、妊娠初期からおこる形態発達の遅れや過剰なレプチンに加え、肥満マウスの示す高プロゲステロン血症が、妊娠中後期の機能的発達の遅れにつながった可能性もある。これらの変化が出産後の泌乳能の低下を導くことが想定される。

以上のように、食餌性肥満は妊娠前の導管構造や、妊娠初期の導管側枝の出芽に影響を及ぼし乳腺の発達を阻害していることが明らかとなった。さらに、肥満による乳腺発達の抑制に、間質脂肪細胞から過剰に分泌されるレプチンが関与していることが示唆された。よって、乳腺が適切に発達し泌乳機能を十分に発揮するためには、妊娠前からの「適度な」栄養状態の維持が必要であることを示している。また、適切な乳腺の発達には適切な脂肪細胞の機能が必要であることを意味しており、乳腺における間質脂肪細胞の役割を解明する上でも重要な知見である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 木 村 和 弘
副 査 教 授 昆 泰 寛
副 査 教 授 稲 葉 睦
副 査 准教授 寺 尾 晶

学 位 論 文 題 名

乳腺発達に及ぼす食餌性肥満の影響： 脂肪細胞分泌因子レプチンの役割

乳腺は生後にその形態と機能を大きく発達させる特徴的な組織である。その発達は性ホルモンにより支配されるが、皮下脂肪組織内に伸長する乳腺組織は脂肪細胞などの間質組織によってもその発達が調節される。しかし、後者の機構は未だ不明な点が多く、多くの動物で見られる肥満、つまり脂肪細胞の肥大による乳腺機能障害の機序も明らかではない。本博士論文では肥満が引き起こす乳腺発達障害の詳細について調べ、乳腺における新たな上皮-間質相互作用やその機構を明らかにすることを目的とした。

実験には高脂肪食誘導性肥満マウスと対照マウスを用いた。妊娠前の肥満群乳腺導管は、対照群に比べて分枝が粗で、径が細かった。乳腺導管は本来、二層の上皮細胞、管腔上皮細胞と筋上皮細胞から構成されるが、肥満群では筋上皮細胞層の一部が欠損し、その周囲には1型コラーゲンを始めとした膠原線維が蓄積した。次に妊娠中の乳腺を調べたところ、対照群では妊娠前期に、導管周囲の膠原線維層の分解を伴って、導管側方へ側枝が盛んに出芽した。しかし、肥満群では妊娠前期に側枝の出芽がほとんど起こらず、中期によりやく出芽が見られ、妊娠中期や後期では腺房発達や乳タンパク質発現が遅延した。つまり、肥満は妊娠前の乳腺組織構造に影響を及ぼし、妊娠早期の乳腺発達を遅延させ、この遅れが泌乳量の減少につながると推察された。

脂肪細胞分泌因子レプチンは肥満群で10倍以上分泌が増加し、レプチン受容体は導管を構成する上皮細胞と、導管周囲の線維芽細胞に発現した。レプチン発現アデノウイルスにより高レプチン血症を誘導したマウスでは乳腺に1型コラーゲンタンパク質が蓄積し、またレプチンは*in vitro*でも線維芽細胞の1型コラーゲン分泌を促進させた。さらにレプチンは乳腺上皮細胞の増殖を抑制した。これらの結果より肥満動物で見られる過剰なレプチンは、乳腺上皮細胞の増殖障害やコラーゲン産生の増加を通じて肥満による乳腺発達抑制機構の一部を担っていることが示唆された。

以上のように、本研究は、乳腺における上皮-間質相互作用機構の新たな一面を明らかに

したものであり、哺乳動物の生理学に貢献が大である。よって、審査委員一同は、上記博士論文提出者、上川昭博氏の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第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。